

**Expression  
von Biofilmkomponenten  
bei ausgewählten *Salmonella enterica*- und  
*Escherichia coli*-Wildtypstämmen sowie  
Untersuchungen zur Funktionalität des  
*adrA*-Gens innerhalb der  
Biofilmregulationskaskade bei  
*Salmonella* Typhimurium**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation

von Werner Joachim Bokranz  
aus Braunschweig

1. Referent:  
2. Referent:  
eingereicht am:  
mündliche Prüfung (Disputation) am:

Prof. Dr. Jürgen Wehland  
Prof. Dr. Helmut Tschäpe  
17.04.2003  
01.09.2003  
(2003)

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Jürgen Wehland, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

RÖMLING, U., BOKRANZ, W., RABSCH, W., ZOGAJ, X., NIMTZ, M. & TSCHÄPE, H. (2003): Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 273 - 285

ZOGAJ, X., BOKRANZ, W., NIMTZ, M. & RÖMLING, U. (2003): Cellulose and curli fimbriae producing Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **71**: 4151 - 4158

ZOGAY, X., NIMTZ, M., ROHDE, M., BOKRANZ, W. & RÖMLING, U. (2001): The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39**: 1452 – 1463



## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Abkürzungen und Fachbegriffe:</b>	<b>I</b>
<b>2. Abbildungsverzeichnis:</b>	<b>IV</b>
<b>3. Tabellenverzeichnis:</b>	<b>VI</b>
<b>4. Anhangsverzeichnis:</b>	<b>VI</b>

## **I. EINLEITUNG:**

<b>I.1. Allgemeines:</b>	<b>1</b>
I.1.1. Zur Taxonomie von <i>Salmonella enterica</i> :	1
I.1.1.1. Typhöse Salmonellosen:	1
I.1.1.2. Enteritische Salmonellosen:	2
I.1.1.3. Salmonellosen bei Tieren:	2
I.1.2. Verschiedene krankheitserregende Formen von <i>Escherichia coli</i> :	3
I.1.2.1. Extraintestinale Infekte:	3
I.1.2.2. Intestinale Infekte:	3
I.1.3. Die Adhärenz als erster Schritt eines jeden Infektionszyklus:	4
I.1.4. EcoR- und LT-Sammlung:	4
<b>I.2. Bakterielle Biofilme:</b>	<b>4</b>
I.2.1. Welchen Nutzen haben Bakterien von der Biofilmbildung?	5
I.2.2. Was induziert Biofilmbildung?	5
I.2.3. Wo sind Biofilme problematisch?	5
<b>I.3. Biofilmbildung bei <i>S. Typhimurium</i>:</b>	<b>6</b>
I.3.1. Wie kann bei <i>S. Typhimurium</i> Biofilmbildung induziert werden?	6
I.3.2. Die vier Hauptphänotypen von <i>S. Typhimurium</i> :	6
I.3.3. Die Komponenten der extrazellulären Matrix:	6
I.3.3.1. Dünne aggregative Fimbrien:	7
I.3.3.2. Zellulose:	8
I.3.4. Die zur Biofilmbildung führende Regulationskaskade:	8
I.3.4.1. Das bivalente <i>agfDEFG-agfBAC</i> -Operon:	8
I.3.4.2. Das <i>bcsABZC</i> -Operon:	9
I.3.4.3. Das <i>adrA</i> -Gen:	9
I.3.4.4. Abweichungen von der Regulationskaskade:	10
<b>I.4. Ziele der Arbeit:</b>	<b>10</b>

## **II. MATERIAL UND METHODEN:**

<b>II.1. Allgemeines:</b>	<b>13</b>
II.1.1. Geräte:	13

II.1.2. Kooperationspartner: .....	15
II.1.3. Computerprogramme: .....	15
II.1.4. Internetadressen für Sequenzvergleiche und Literatursuche: .....	15
<b>II.2. Chemikalien: .....</b>	<b>16</b>
<b>II.3. Rezepte für Standardmedien:.....</b>	<b>16</b>
II.3.1. Flüssigmedien und Agarplatten:.....	16
<b>II.4. Stämme und Stammsammlungen: .....</b>	<b>19</b>
II.4.1. Verwendete Stämme: .....	19
II.4.2. Stammsammlungen: .....	20
<b>II.5. Mikrobiologische Arbeitsmethoden:.....</b>	<b>20</b>
II.5.1. Gießen von Agarplatten: .....	20
II.5.2. Antibiotika (Sigma):.....	20
II.5.3. Animpfen von Flüssigmedien bzw. Ausstreichen und Ausplattieren von Bakterienstämmen auf Agarplatten: .....	21
II.5.4. Inkubationsbedingungen: .....	21
II.5.4.1. Inkubation auf einer Agarplatte: .....	21
II.5.4.2. Inkubation in Flüssigkultur: .....	21
II.5.4.2.1. Aerophile Bedingungen: .....	21
II.5.4.2.2. Mikroaerophile Bedingungen:.....	22
II.5.5. Herstellung von Glycerolstocks: .....	22
II.5.6. Oberflächenspannungstest:.....	22
II.5.7. Replikaplattierung: .....	22
II.5.8. Ermittlung der Phänotypauftrittshäufigkeit bei verschiedenen <i>Escherichia coli</i> - und <i>Salmonella</i> -Stämmen:.....	23
II.5.8.1. EcoR- und LT-Sammlung: .....	23
II.5.8.2. Isolierung und Phänotypbestimmung von Enterobacteriaceae aus humanen Stuhlproben:.....	23
II.5.8.3. Uropathogene <i>Escherichia coli</i> -Stämme:.....	23
II.5.9. Bestimmung der Artzugehörigkeit von Bakterienklonen anhand eines biochemischen Profils:.....	23
II.5.10. Bestimmung des Serotyps: .....	24
II.5.11. Prototrophie-Test:.....	24
II.5.12. Test auf <i>rpoS</i> -Funktionalität: .....	24
II.5.13. Motilitätstest:.....	24
<b>II.6. Methoden der Proteinanalyse:.....</b>	<b>25</b>
II.6.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):..	25
II.6.1.1. Aufbereitung der Proben: .....	25
II.6.1.2. Molekulargewichtsmarker:.....	25
II.6.1.3. Elektrophoresebedingungen (Standard): .....	25
II.6.1.4. Färben von Gelen: .....	26

II.6.2. Western Blotting (halbtrockenes Verfahren): .....	27
II.6.2.1. Blotbedingungen: .....	27
II.6.2.2. Immunoblotdetektion: .....	27
II.6.3. AgfA-Nachweis: .....	28
II.6.3.1. Anreicherung von AgfA: .....	28
II.6.3.2. AgfA-Nachweis via MALDI/TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time Of Flight - Mass Spectroscopy): .....	29
II.6.3.3. AgfA-Nachweis im Coomassiegel und auf dem Western Blot: .....	29
II.6.4. Zellfraktionierung: .....	30
II.6.4.1. Zellaufschluss und Probenaufbereitung: .....	30
II.6.4.2. NADH-Oxidase-Test: .....	32
II.6.4.2.1. Standard-Reaktionsansatz: .....	32
II.6.4.2.2. Variante: .....	33
II.6.4.2.3. Funktionstest: .....	33
II.6.4.2.4. Spezifitätstest: .....	33
II.6.4.3. Peroxidaseaktivitätsnachweis über Häm: .....	33
II.6.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford: .....	34
<b>II.7. Zellulosedetektion: .....</b>	<b>34</b>
II.7.1. Isolierung von Zellulose mit der Updegraff-Methode: .....	34
II.7.2. Gaschromatographie (durchgeführt von Herrn M. Nimtz): .....	34
II.7.2.1. Benötigte Reagenzien: .....	34
II.7.2.2. Derivatisierung der Monosaccharide: .....	35
II.7.2.3. Trimethylsilylierung: .....	35
II.7.2.4. Gaschromatographie (GC): .....	35
<b>II.8. Methoden der Nukleinsäureanalyse: .....</b>	<b>35</b>
II.8.1. DNS-Techniken: .....	35
II.8.1.1. Agarosegelelektrophorese: .....	35
II.8.1.2. Konzentrationsbestimmung via Agarosegel: .....	36
II.8.1.3. Aufreinigung eines DNS-Fragmentes aus einem TAE-Agarosegel mit einem Elutionskitt: .....	37
II.8.1.4. Isolierung von DNS: .....	37
II.8.1.4.1. Extraktion von Gesamt-DNS: .....	37
II.8.1.4.2. Extraktion von Plasmid-DNS: .....	37
II.8.1.5. DNS-Primer: .....	38
II.8.1.5.1. Design der Primer: .....	38
II.8.1.5.2. Verwendete Primer: .....	38
II.8.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR): .....	40
II.8.1.7. DNS-Sequenzierung: .....	41
II.8.1.7.1. Vorgehensweise: .....	42
II.8.1.7.2. Sequenziergel: .....	42
II.8.1.8. DNS-Spaltung mit Restriktionsenzymen: .....	43
II.8.1.9. Ligation: .....	43
II.8.1.10. Dephosphorylierung: .....	43
II.8.2. RNS-Techniken: .....	44
II.8.2.1. Isolierung von Gesamt-RNS aus Zellen in der stationären Wachstumsphase: ..	44
II.8.2.1.1. RNS-Präparation von auf Agarplatte gewachsenen Zellen: .....	44
II.8.2.1.2. RNS-Präparation von Zellen aus Flüssigkultur: .....	46

II.8.2.2. Auftrennung der RNS in einem denaturierenden Agarosegel:	46
II.8.2.2.1. Aufbereitung der Proben:	46
II.8.2.2.2. Der Lauf:	47
II.8.2.3. Northern Blot:	47
II.8.2.3.1. Verfahren:	47
II.8.2.3.2. Herstellung der DNS-Sonden:	48
II.8.2.3.3. Sondenmarkierung mit Rad Prime Labelling System (Life Technologies):	48
II.8.2.3.4. Hybridisierung:	49
II.8.2.3.5. Abwaschen der Sonden:	49
II.8.2.4. Primer Extension:	50
II.8.2.4.1. Radioaktive Markierung der Primer durch die T4-Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim):	50
II.8.2.4.2. Herstellung der A-, T-, G- und C-Sequenzleitern:	50
II.8.2.4.3. Primer Extension:	50
II.8.2.4.4. Herstellung und Lauf des denaturierenden Harnstoff-Acrylamidgeles:	51
<b>II.9. Klonierungen und Herstellung von Mutanten:</b>	<b>52</b>
II.9.1. Vektoren:	52
II.9.2. Transformation:	52
II.9.2.1. Transformation durch Hitzeschock:	52
II.9.2.1.1. Herstellung chemokompetenter Zellen (SEM-Zellen):	52
II.9.2.1.2. Transformation:	53
II.9.2.2. Elektroporation:	53
II.9.2.2.1. Herstellung elektrokompenter Zellen:	53
II.9.2.2.2. Elektroporation:	53
II.9.2.3. Triparental Mating:	54
II.9.3. Klonierung von PCR-Fragmenten:	54
II.9.3.1. Verfahren:	54
II.9.3.2. Rousconi-Test:	56
II.9.4. Phagentransduktion:	56
II.9.4.1. Herstellung des Phagenlysates:	56
II.9.4.1.1. Herstellung eines Phagenlysates ( <i>S. Typhimurium</i> ):	56
II.9.4.1.2. Variante ( <i>S. Enteritidis</i> ):	57
II.9.4.2. Testen des Phagenlysates:	57
II.9.4.3. Transduktion:	57
II.9.4.4. Test auf lytische Phagen:	57
II.9.4.5. Nachweis des Vorhandenseins lysogener Phagen im Bakteriengenom:	58
II.9.5. Gendelektion im Leserahmen:	58
<b>II.10. Messung der Genexpression:</b>	<b>59</b>
II.10.1. $\beta$ -Galaktosidasetest:	59
<b>III. ERGEBNISSE:</b>	<b>61</b>
<b>III.1. Phänotypdokumentation:</b>	<b>61</b>
III.1.1. Untersuchung der Phänotypvariabilität bei verschiedenen <i>Escherichia coli</i> - und <i>Salmonella</i> -Wildtypstämmen:	61



III.1.2. Korrelation von Phänotyp und molekularen Befunden: .....	64
III.1.2.1. Der AgfA-Nachweis: .....	64
III.1.2.1.1. Coomassie-Gel und Western Blot: .....	64
III.1.2.1.2. MALDI/TOF-MS: .....	65
III.1.2.2. Der Zellulosenachweis: .....	66
III.1.2.3. Expression von AgfA und Zellulose bei <i>Salmonella</i> und <i>E. coli</i> : .....	67
III.1.2.4. Phänotypvergleich zwischen den einzelnen <i>Salmonella</i> -Gruppierungen: .....	69
III.1.2.5. Korrelation von CF-Bindungsgrad und CR-Phänotyp: .....	71
III.1.2.6. Phänotypen anderer Spezies: .....	72
III.1.3. Häufigkeitsverteilung der Phänotypen bei den einzelnen Stammgruppen: .....	72
III.1.3.1. Phänotypdiversität und Aufttrittshäufigkeit bei frischen <i>E. coli</i> -Isolaten: .....	72
III.1.3.1.1. Durchschnittliche Anzahl von Phänotypen: .....	73
III.1.3.1.2. Vergleich der Phänotypdiversität bei Fäkalisolaten und uropathogenen <i>E. coli</i> -Stämmen: .....	73
III.1.3.1.3. Prozentuale Anteile der AgfA- und der zelluloseproduzierenden Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) bei <i>E. coli</i> : .....	74
III.1.3.2. Phänotypdiversität und Aufttrittshäufigkeit bei EcoR- und LT-Sammlung: .....	75
III.1.3.2.1. Durchschnittliche Anzahl von Phänotypen pro Stamm: .....	75
III.1.3.2.2. Prozentuale Anteile der AgfA- und der zelluloseproduzierenden Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) bei den Stämmen beider Sammlungen: .....	76
III.1.4. Besonderheiten bezüglich der Bildung von AgfA und Zellulose: .....	77
III.1.4.1. Expression von AgfA und Zellulose unter Eisenmangelbedingungen: .....	77
III.1.4.2. AgfA-Varianten mit abnormem Laufverhalten: .....	79
III.1.5. Zusammenhänge zwischen Phänotyp und anderen Parametern: .....	82
III.1.5.1. Phänotyp und Serotyp: .....	82
III.1.5.1.1. Serotypen der Fäkalisolate und der uropathogenen <i>E. coli</i> -Stämme: .....	82
III.1.5.1.2. Korrelation zwischen Phänotyp und Serotyp bei <i>E. coli</i> -Stämmen derselben Probe: .....	83
III.1.5.1.3. Gemeinsame Serotypen von kommensalen und uropathogenen <i>E. coli</i> -Stämmen: .....	84
III.1.5.2. Phänotyp, Motilität und Prototrophie: .....	84
III.1.5.2.1. Zusammenhang zwischen Phänotyp und Prototrophie: .....	84
III.1.5.2.2. Zusammenhang zwischen Phänotyp und Motilität: .....	84
III.1.6. Die genetischen Grundlagen der Biofilmbildung bei verschiedenen <i>Salmonella</i> -Wildtypstämmen: .....	86
III.1.6.1. Korrelation von Phänotyp und <i>rpoS</i> -Funktionalität: .....	87
<i>E. coli</i> .....	87
III.1.6.2. Überprüfung der Funktionsweise der Biofilmbildungskaskade bei <i>Salmonella</i> -Wildtypstämmen auf genetischer Ebene: .....	89
III.1.6.3. Untersuchung des bivalenten <i>agfDEFG-agfBAC</i> -Operons bei ausgewählten <i>Salmonella</i> -Wildtypstämmen: .....	91
III.1.6.3.1. Test auf das Vorhandensein von Insertionen bzw. Deletionen im bivalenten Operon: .....	91
III.1.6.3.2. Sequenzvergleiche des <i>agfD</i> -Gens sowie der intergenischen Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfBAC</i> -Operon bei ausgewählten <i>Salmonella</i> -Stämmen: .....	93
<b>III.2. Das <i>adrA</i>-Gen von <i>S. Typhimurium</i> .....</b>	<b>102</b>
III.2.1. Begleitende Parameter der Biofilmbildung: .....	102
III.2.1.1. Tensidbildung: .....	102

III.2.2. Untersuchungen zur Vermittlerfunktion des <i>adrA</i> -Gens zwischen <i>agfD</i> und <i>bcsABZC</i> :	103
III.2.2.1. Abhängigkeit des <i>adrA</i> von Produkten des <i>agfBAC</i> -Operons:	103
III.2.2.2. Werden zur Zellulosebiosynthese außer <i>adrA</i> noch weitere von AgfD abhängige Gene benötigt?	103
III.2.2.3. Beeinflusst die polare Insertion im <i>adrA</i> stromabwärts liegende Gene?	104
III.2.2.4. Reicht die zytosolische Domäne des AdrA zur Komplementation aus?	105
III.2.2.5. Gibt es zwischen Transkription des <i>adrA</i> und Zelluloseproduktion noch Schritte, die von OmpR oder $\sigma^S$ abhängig sind?	105
III.2.2.6. Ist das <i>agfD</i> -Gen nach der Transkription abhängig von OmpR?	106
III.2.2.7. Funktioniert die Komplementation durch pWJB30 auch bei Vertretern anderer Spezies?	106
III.2.3. Untersuchungen zum AdrA-Protein:	107
III.2.3.1. Nachweis des AdrA im Western Blot:	107
III.2.3.2. Lokalisation des AdrA in der Zelle:	108
III.2.4. Untersuchungen zur Transkription des <i>adrA</i> :	110
III.2.4.1. Wie groß ist das primäre Transkript des <i>adrA</i> ?	110
III.2.4.2. Wo liegt der Transkriptionsstart des <i>adrA</i> ?	112
III.2.4.3. Die Promotorregion des <i>adrA</i> :	113
III.2.4.4. Vergleich der <i>agfB</i> -Promotorsequenz mit der des <i>adrA</i> -Promotors:	114
III.2.5. Die gesamte zur Biofilmbildung führende Regulationskaskade:	115

## **IV. DISKUSSION: .....117**

<b>IV.1. Die Phänotypdiversität der einzelnen Stammgruppen:</b>	<b>120</b>
IV.1.1. Welche biologische Funktion hat eine hohe bzw. geringe Phänotypdiversität?	120
IV.1.2. Die Phänotypdiversität innerhalb einzelner Stämme bei EcoR- und LT-Sammlung:	122
IV.1.3. Der Einfluss von Eisenmangel auf die Ausprägung von Biofilmen: ...	123
IV.1.4. AgfA-Varianten mit abnormem Laufverhalten:	124
IV.1.5. Zusammenhänge zwischen Phänotyp, Serotyp, Prototrophie und Motilität:	125
IV.1.6. RpoS als Sigmafaktor der stationären Phase:	125
IV.1.7. Ist die Regulationskaskade, die zur Ausbildung eines Biofilms führt, bei allen <i>Salmonella</i> -Spezies gleich?	126
IV.1.8. Der Einfluss von Punktmutationen im <i>agfD</i> -Promotor auf die Transkriptionsrate des <i>agfD</i> :	126
<b>IV.2. Das <i>adrA</i>-Gen von <i>S. Typhimurium</i> .....</b>	<b>127</b>
IV.2.1. Die Rolle des AdrA innerhalb der Biofilm-regulationskaskade:	127
IV.2.2. Gibt es ergänzende Regulationsfaktoren in der Kaskade?	128
IV.2.3. Die Stabilität des primären <i>adrA</i> -Transkriptes:	129
<b>IV.3. Ausblick: .....</b>	<b>129</b>

---

<b><u>V. ZUSAMMENFASSUNG:.....</u></b>	<b><u>131</u></b>
<b><u>VI. LITERATUR: .....</u></b>	<b><u>133</u></b>
<b><u>VII. ANHANG:.....</u></b>	<b><u>147</u></b>
<b><u>VIII. DANKSAGUNGEN: .....</u></b>	<b><u>163</u></b>



**1. Abkürzungen und Fachbegriffe:**

A	Adenin
Aa	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AdrA	Produkt des „AgfD-regulierten Gens A“
agf	aggregative Fimbrien
AgfA, B, C, D, E, F, G	Proteine für die Expression dünner aggregativer Fimbrien
AK	Antikörper
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
AT rav; AT rmax	Rotorspezifische Angaben
bas	Phänotyp “brown and smooth”
(bb)	bright brownish
BcsA, B, Z, C	Zur Zellsynthese benötigte Proteine
bdar	Phänotyp “brown, dry and rough”
BL	Abblocklösung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
C	zytosolische Fraktion; Cytosin
c-di-GMP	zyklisches Di-Guanosinmonophosphat
CelR2	Regulatorprotein für Zelluloseproduktion bei <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
CF	Calcofluor
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CR	Kongorot
CsgA, B, C, D, E, F, G	Proteine für die Expression von Curli, den zu dünnen aggregativen Fimbrien homologen Strukturen
D	rechtsdrehend
2,2-D.	2,2-Dipyridyl
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
(db)	dark brownish
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
(dg)	dark grey
DGC	Diguanylatzyklase
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotid
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EcoR-Sammlung	<i>Escherichia coli</i> -Sammlung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGTA	1,2-Bis-[2-aminoethoxyethan]-N,N',N'-tetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immunnachweis
EM	Elektronenmikroskop
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung
(g)	grey
G	Guanin
Gal	Galaktose
Gen	Gentamycin
GET-Lösung	Glukose-EDTA-Tris-Lösung
° C	Grad Celsius
GST	Glutathion-S-Transferase
gWS	geringe Wirtsspezifität
h	Stunde
H-Antigene	Geißelantigene
HlyA	Hämolysin A
H-NS	Histone-like Protein S
HT	Hybridisierungstemperatur
hWS	hohe Wirtsspezifität
IgG	Immunglobulin G
IM	innere Membran
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IVSs	Intervening Sequences
K-Antigene	Polysaccharidantigene der äußeren Membran
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
Km	Kanamycin
kV	Kilovolt
l	Liter
L	linksdrehend
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidasegen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LT	Lilleengen Type
m	männlich
M	Molar; Masse
mA	Milliampere
Mac-Lac	Mac-Conkey-Agar + Laktose
MALDI/TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time Of Flight - Mass Spectroscopy
min	Minuten
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μCi	Maß für Radioaktivität (Mikrocurie)
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer

μM	Mikromolar
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS
MU	Miller-Einheiten (Units)
MudJ-Vektor	Derivat des Phagen Mu mit <i>lacZ</i> -Gen und Km-Resistenzkassette
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
Nal	Nalidixinsäure
NFA	Nicht-Fimbrienassoziierte Adhäsine
nm	Nanometer
nsec	Nanosekunden
nt	nicht typisierbar
Ω	Ohm (Einheit für Widerstand)
O.D.	Optische Dichte
O-Antigene	Oberflächenantigene
OM	äußere Membran
OmpA	Outer membrane protein A
OmpR	Outer membrane protein Regulator
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	Offener Leserahmen
(p)	pinkish
pas	Phänotyp "pink and smooth"
PAP	Pyleonephritis-Assoziierte Pili
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pdar	Phänotyp "pink, dry and rough"
P-Fimbrien	siehe PAP
PFU	Plaque Forming Unit
pg	Pikogramm
Ph.	Phänotyp
PleD	Regulatorprotein von <i>Caulobacter crescentus</i>
psi	Druckeinheit
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rauh	ohne Antigene
rbabr	Phänotyp "rough, big and brownish"
rbaw	Phänotyp "rough, big and white"
(rbb)	reddish bright brownish
rbdar	Phänotyp "redbrownish, dry and rough"
rdar	Phänotyp "red, dry and rough"
rmax	Maximalradius
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RpoS	Sigmafaktor σ <sup>S</sup>
rRNS	Ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur
(rsw)	reddish snow white

S	Svedberg-Einheit
s.	siehe
saw	Phänotyp “smooth and white”
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel- elektrophorese
sec	Sekunden
SEPEC	Sepsisverursachende <i>Escherichia coli</i>
Sm	Streptomycin
SSC	Natriumcitratpuffer
(sw)	snow white
STABW	Standardabweichung
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Puffer
TBST	Tween-TBS
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TE	Tris-EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
U	Enzymarbeitseinheiten (Units)
UK	United Kingdom
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>
UZ!	Ultrazentrifugation
V	Volt
(vdb)	very dark brownish
vgl.	vergleiche
VTEC	Verotoxinproduzierende <i>Escherichia coli</i>
w	weiblich
W	Watt
(wr)	white rim
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galaktosid
YaiC	dem AdrA-Protein von <i>Salmonella enterica</i> homologes <i>Escherichia coli</i> -Protein
Z.	Zellulose
Z!	Zentrifugation

## **2. Abbildungsverzeichnis:**

**Abb. 1:** Die vier Hauptphänotypen von *S. Typhimurium* ATCC14028: [Seite 7](#)

**Abb. 2:** Regulationskaskade, die bei *S. Typhimurium* ATCC14028-1s zur Biofilmbildung führt: [Seite 11](#)

**Abb. 3:** Frische und ältere Proteinpräparation des *S. Typhimurium*-Stammes MAE 52: [Seite 30](#)

**Abb. 4:** Fließschema einer Zellfraktionierung: [Seite 31](#)

**Abb. 5:** TBE-Kontrollgel mit drei aufbereiteten Gesamt-RNS-Proben: [Seite 45](#)

**Abb. 6:** Kontrollabschnitt eines denaturierenden RNS-Agarosegels: [Seite 47](#)



- Abb. 7:** Aufbau der Apparatur für den Northern Blot: [Seite 48](#)
- Abb. 8:** Schema einer Standardklonierung: [Seite 55](#)
- Abb. 9:** Formenvariabilität an CR-Phänotypen bei *E. coli* und *Salmonella*: [Seite 62/63](#)
- Abb. 10:** AgfA-Signale bei 17 kDa im Coomassie-Gel (oben) und Western Blot (unten) jeweils für 28° C und 37° C derselben Stammserie (Phänotypangaben: 28° C/37° C): [Seite 64](#)
- Abb. 11:** Die fünf verschiedenen Abstufungen in der Stärke des AgfA-Signals am Beispiel des Blots: [Seite 65](#)
- Abb. 12:** MALDI/TOF-MS-Detektionskurven von 1:100-Verdünnungen des *S. Enteritidis*-Stammes 00-04026/64 bei 28° C (A) sowie bei 37° C (B): [Seite 65](#)
- Abb. 13:** Zellulosedetektionschromatogramme des *S. Typhimurium*-Stammes 00-04037/65 bei 28° C (A) und bei 37° C (B): [Seite 66](#)
- Abb. 14:** Relative Auftrittshäufigkeit der einzelnen Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) bei den beiden *Salmonella*-Pathogenitätsgruppen hWS (hohe Wirtsspezifität) und gWS (geringe Wirtsspezifität): [Seite 70](#)
- Abb. 15:** Die vier Abstufungen im CF-Bindungsgrad: [Seite 71](#)
- Abb. 16:** Durchschnittliche Anzahl von Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Probe, gezeigt für frisch isolierte kommensale und uropathogene *E. coli*-Stämme: [Seite 73](#)
- Abb. 17:** Relative Auftrittshäufigkeit der einzelnen Phänotypen in jeder Probe bei frischen *E. coli*-Isolaten: [Seite 74](#)
- Abb. 18:** Relative Auftrittshäufigkeit der einzelnen AgfA- bzw. Zellulose-Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) für die frisch isolierten kommensalen und uropathogenen *E. coli*-Stämme: [Seite 75](#)
- Abb. 19:** Durchschnittliche Anzahl von Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm, gezeigt für kommensale und uropathogene *EcoR*-Stämme (*E. coli*) sowie für pathogene LT-Stämme (*Salmonella*): [Seite 76](#)
- Abb. 20:** Relative Auftrittshäufigkeit der einzelnen AgfA- bzw. Zellulose-Phänotypgruppen (28° C/37° C) bei den kommensalen und uropathogenen *EcoR*- sowie die pathogenen LT-Stämme: [Seite 76](#)
- Abb. 21:** Einfluss von Eisenmangel auf die AgfA-Expression gezeigt im Coomassie-Gel (oben) und auf einem Western Blot (unten): [Seite 77](#)
- Abb. 22:** AgfA-Varianten mit abnormem Laufverhalten im SDS-Gel gezeigt im Coomassie-Gel (oben) und auf einem Western Blot (unten): [Seite 79](#)
- Abb. 23:** Durch PCR amplifiziertes *agfA*-Gen: [Seite 80](#)
- Abb. 24:** Sequenzvergleiche der *agfA*-Gene von *E. coli* K12, Fec110 und Urp41 sowohl auf DNS- als auch auf Proteinebene: [Seite 80/81](#)
- Abb. 25:** Die fünf Motilitätsstufen: [Seite 85](#)
- Abb. 26:** Wildtyp und Mutanten des *S. Enteritidis*-Stammes 00-04026/62: [Seite 90](#)
- Abb. 27:** Wildtyp und Mutanten des *S. Enteritidis*-Stammes 00-04026/64 und des *S. Typhimurium*-Stammes 00-04037/65: [Seite 91](#)
- Abb. 28:** PCR-Produkte über das komplette bivalente *agfDEFG-agfBAC*-Operon der zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme: [Seite 92](#)
- Abb. 29:** *agfD*-Promotorregion dreier *S. Typhimurium*-Stämme: [Seite 93](#)
- Abb. 30:** Die beiden *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Sequenzfamilien: [Seite 94](#)
- Abb. 31:** Intergenische Region und *agfD*-Gen des *S. Typhi*-Stammes CT 18, des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1 sowie verschiedener *S. Enteritidis*-Stämme: [Seite 95 - 100](#)
- Abb. 32:** Oberflächenspannungstest bei ausgewählten *S. Typhimurium*-Stämmen: [Seite 102](#)
- Abb. 33:**  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitätsmessungen bei verschiedenen *S. Typhimurium*-Stämmen, die eine MudJ-Kassette im *adrA* tragen: [Seite 103](#)
- Abb. 34:** Komplementation vom weißen zum pinken Phänotyp durch pWJB30 beim *S. Typhimurium*-Stamm ADR 1b: [Seite 104](#)
- Abb. 35:** Lage des *adrA* auf dem Chromosom zwischen *psiF* und *proC*: [Seite 104](#)
- Abb. 36:** Spezifische AdrA-Signale bei 42 bzw. 17 kDa auf einem Western Blot: [Seite 107](#)
- Abb. 37:** Spezifische AdrA-Signale bei 42 bzw. 17 kDa auf einem Western Blot: [Seite 108](#)
- Abb. 38:** OmpA- und AdrA-Detektion in zytosolischer Fraktion (C), innerer Membranfraktion (IM) und äußerer Membranfraktion (OM) zweier Zellfraktionierungen, bei denen unterschiedliche Detergenzien zur Trennung beider Membranfraktionen verwendet wurden: [Seite 109](#)
- Abb. 39:** OmpA- und AdrA-Detektion in zytosolischer (C) und Gesamt-Membranfraktion (MF) einer Zellfraktionierung, bei der eine weitere Auftrennung der Gesamt-Membranfraktion in innere und äußere Membranfraktion durch Behandlung mit Detergenz unterblieb: [Seite 109](#)
- Abb. 40:** *adrA*-mRNS-, *agfD*-mRNS- und 16 S-rRNS-Signale auf einem Northern Blot: [Seite 110](#)
- Abb. 41:** *adrA*-mRNS-, *agfD*-mRNS- und 16 S-rRNS-Signale der *S. Typhimurium*-Stämme MAE 51 und MAE 52 auf einem Northern Blot aus unter mikroaerophilen Bedingungen angezogenen Flüssigkulturen: [Seite 111](#)
- Abb. 42:** Primer Extension-Gel: [Seite 112](#)
- Abb. 43:** Promotorregionen des *adrA*-Gens verschiedener Spezies: [Seite 113](#)
- Abb. 44:** Gegenüberstellung der Promotorregionen von *adrA* und *agfB* des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1: [Seite 114](#)
- Abb. 45:** Schema der zur Biofilmbildung führenden Regulationskaskade bei *S. Typhimurium* MAE 52: [Seite 115](#)

### **3. Tabellenverzeichnis:**

- Tab. 1:** Für Genexpressionsstudien und Phagentransduktion verwendete Bakterienstämme: [Seite 19/20](#)  
**Tab. 2:** Für Klonierungen und Phagentransduktion verwendete Hilfsstämme: [Seite 20](#)  
**Tab. 3:** Arbeitskonzentrationen der verwendeten Antibiotika: [Seite 21](#)  
**Tab. 4:** Zusammensetzung von SDS-Gelen verschiedener Konzentration: [Seite 26](#)  
**Tab. 5:** Zur Detektion verwendete Antikörper: [Seite 28](#)  
**Tab. 6:** Markerbanden des Smartladder (Eurogentec) mit entsprechenden DNS-Mengenangaben: [Seite 36](#)  
**Tab. 7:** Liste der verwendeten Primer mit Angaben zu ihrem Verwendungszweck: [Seite 38 - 40](#)  
**Tab. 8:** Liste der verwendeten Vektoren: [Seite 52](#)  
**Tab. 9:** AgfA- und Zellulosedetektion bei *Salmonella* und *E. coli*: [Seite 67 - 69](#)  
**Tab. 10:** Bei allen getesteten *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen aufgetretene CF-Bindungsgrade: [Seite 71](#)  
**Tab. 11:** Zusammenstellung aller neben *E. coli* aus Fäkalproben isolierten Bakterienspezies und ihrer Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C): [Seite 72](#)  
**Tab. 12:** AgfA- und Zelluloseexpression unter Eisenmangelbedingungen bei ausgewählten *S. Enteritidis*-, *S. Typhimurium*- und *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämmen sowie einem *E. coli*-Stamm: [Seite 78](#)  
**Tab. 13:** Serotypspezifische Änderungen in der Phänotypausprägung unter Einfluss von 2,2-Dipyridyl bei *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen: [Seite 79](#)  
**Tab. 14:** Phänotypdiversität bei frischen *E. coli*-Isolaten mit gleichem Serotyp: [Seite 83](#)  
**Tab. 15:** Gegenüberstellung von Serotyp, Phänotyp und Motilität bei ausgewählten *Salmonella*-Stämmen: [Seite 85/86](#)  
**Tab. 16:** Korrelation von *rpoS*-Funktionsbeeinträchtigung und Phänotyp: [Seite 87/88](#)  
**Tab. 17:** Veränderungen im Phänotyp (28° C/37° C) bedingt durch gezieltes Ausschalten bestimmter Schlüsselgene bei *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*: [Seite 89](#)  
**Tab. 18:** Herkunftsorte der zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme: [Seite 95](#)  
**Tab. 19:** Gegenüberstellung von Phänotyp und den entsprechenden Mutationen im *agfD*-Promotor bei *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*: [Seite 101](#)  
**Tab. 20:** Phänotypen von *ompR*- und *rpoS*-Negativmutanten der *S. Typhimurium*-Stämme MAE 51 und MAE 52: [Seite 106](#)

### **4. Anhangsverzeichnis:**

- VII.A:** Übersicht über alle *Salmonella*-Stämme bezogen vom Robert-Koch-Institut, Wernigerode: [Seite 147 - 149](#)  
**VII.B:** LT-Sammlung (LILLENGEN 1948): [Seite 149/150](#)  
**VII.C:** Fäkalisolate; *E. coli* und andere Spezies (frische Isolate): [Seite 150 - 153](#)  
**VII.D:** Uropathogene *E. coli*-Stämme (frische Isolate) und andere Spezies: [Seite 153 - 155](#)  
**VII.E:** EcoR-Sammlung (*E. coli*): [Seite 155 - 157](#)  
**VII.F:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Abstrichprobe bei den frischen *E. coli*-Fäkalisolaten: [Seite 157/158](#)  
**VII.G:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Urinprobe bei den frischen uropathogenen *E. coli*-Isolaten: [Seite 158](#)  
**VII.H:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Fäkal- bzw. Urinprobe bei anderen Spezies als *E. coli*: [Seite 158/159](#)  
**VII.I:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm der EcoR-Fäkalisolate: [Seite 159/160](#)  
**VII.J:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm der EcoR-UPEC-Stämme: [Seite 160](#)  
**VII.K:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm der LT-Stämme: [Seite 161](#)

# I. Einleitung:

*Escherichia coli* und *Salmonella enterica* sind eng miteinander verwandte gramnegative Stäbchen. Während *E. coli* zur intakten Darmflora von Säugern, Vögeln, Reptilien und auch Amphibien gehört, löst *S. enterica* in der Regel Krankheitssymptome innerhalb dieser Wirtstiere aus. Es gibt allerdings auch *E. coli*-Stämme, die unter bestimmten Voraussetzungen und an bestimmten Orten des Wirtsorganismus Krankheitserreger darstellen.

## I.1. Allgemeines:

### I.1.1. Zur Taxonomie von *Salmonella enterica*:

Die Gattung *Salmonella* gehört zur Familie *Enterobacteriaceae* und wird zum Stamm (Tribus) *Escherichiae* gezählt (BLOBEL & SCHLIEßER 1981). *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* stellen nach den neuesten Erkenntnissen die beiden einzigen Spezies dieser Gattung dar (BOYD ET AL., 1996; KINGSLEY ET AL., 2000; REEVES ET AL., 1989). *Salmonella bongori* kommt überwiegend bei Reptilien vor und spielt bei menschlichen Erkrankungen kaum eine Rolle. Zu *Salmonella enterica* hingegen zählen zahlreiche humanpathogene Serotypen.

Anhand von biochemischen und serologischen Merkmalen lässt sich *Salmonella enterica* in sieben Subspezies unterteilen. Für den Menschen ist lediglich eine dieser Subspezies, nämlich *Salmonella enterica subspecies enterica*, von großer Bedeutung. Infektionen mit Vertretern der anderen Subspezies kommen beim Menschen eher selten vor (KINGSLEY ET AL., 2000). Die Unterart *Salmonella enterica subspecies enterica* setzt sich aus über 2000 verschiedenen Serotypen zusammen, die anhand ihrer spezifischen Oberflächen-(O-Antigene) und Geißelantigene (H-Antigene) voneinander unterschieden werden können (KAYSER ET AL., 1998). Fälschlicherweise wurden diesen Serotypen in der Vergangenheit Artnamen zugeordnet, welche bis heute zur Unterscheidung der einzelnen Serotypen Verwendung finden. So lautet z.B. die offizielle Bezeichnung für den Typhuserreger „*Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi*“. Der Einfachheit halber werden im Folgenden lediglich Gattung und Serotyp zur Bezeichnung eines speziellen Serotyps angegeben, also im Falle des Typhuserregers lediglich *Salmonella Typhi*.

In den Abschnitten I.1.1.1. – I.1.1.3. sind die wichtigsten Serotypen im Hinblick auf Krankheitsbild und Wirt aufgeführt.

#### I.1.1.1. Typhöse Salmonellosen:

Zu den Erregern dieses Krankheitsbildes gehören *S. Typhi* sowie *S. Paratyphi A*, *B* und *C*. Diese Serotypen stellen Krankheitserreger dar, welche ausschließlich durch menschliche Ausscheider verbreitet werden. Die Übertragung erfolgt direkt durch Schmierinfektion oder indirekt durch orale Aufnahme der Keime mit kontaminiertem Trinkwasser bzw. kontaminierter Nahrung. Nach der Infektion können die Erreger für Monate oder auch Jahre im Wirt verbleiben, ohne bemerkt zu werden. Der infizierte Mensch kann dann als sogenannter Dauerausscheider permanent eine Infektionsquelle für andere Menschen darstellen (MIMS ET AL., 1998).

Der Infektionszyklus beginnt mit der Adhärenz der Bakterienzellen an Zellen des Jejunum. Es folgt eine Invasion der Mukosa durch Endozytose. Die die Bakterienzellen enthaltenden Vesikel gelangen durch die Mukosa hindurch in die Subserosa, wo sie von Makrophagen phagozytiert werden. Über die Makrophagen, in denen die Vermehrung der Bakterien erfolgt, gelangen sie in die Mesenterial-Lymphknoten. Von hier aus erfolgt - nach Ausbruch aus den Makrophagen - sowohl lymphogene als auch hämatogene Streuung der Keime zu diversen Zielorganen, wie Leber, Milz, Knochenmark, Gallenwege, Peyer-Plaques und sogar der Haut,

wo eine sekundäre Ansiedlung der Bakterien einsetzt (KAYSER ET AL., 1998; MIMS ET AL., 1998). In der Leber erfolgt die Vermehrung der Keime in den Kupfferschen Sternzellen. Über das reticoendotheliale System gelangen die Bakterienzellen wieder in die Blutbahn. Über die Galle erfolgt eine erneute Invasion des Dünndarmes mit folgender Entzündung des Darmes (MIMS ET AL., 1998).

Die Krankheitssymptome bei einer typhösen Salmonellose sind hohes Fieber, Verminderung der Leukozytengesamtzahl (Leukopenie), Verlangsamung der Herzschlagfrequenz (Bradykardie), Roseolen am Abdomen, Milzschwellung, Durchfall, Darmblutungen, Kopfschmerzen und Benommenheit (KAYSER ET AL., 1998).

### I.1.1.2. Enteritische Salmonellosen:

Zu den Serotypen, die beim Menschen eine selbstlimitierende Gastroenteritis, eine infektiöse Lebensmittelvergiftung, hervorrufen, gehören *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Die Übertragung erfolgt hier über verdorbene Lebensmittel und Trinkwasser sowie über Haustiere und deren Ausscheidungen. Analog zur typhösen Salmonellose beginnt die Infektion mit der Adhärenz der Bakterien an Zellen des Ileum und Kolon. Es folgt die Invasion der Mukosa, welche durch Invasinproteine auf der Oberfläche der Salmonellen induziert wird. Die Motilität der Salmonellen unterstützt hierbei das Durchdringen der Schleimschicht, ist aber nicht essentiell (FINLAY & SIEBERS 1995). Mikrovilli werden zerrissen und die Zellmembran der Epithelzellen aufgefaltet. Die Bakterien dringen mittels Vakuolenbildung in die Zellen des Darmepithels ein. Diese Vakuolen fusionieren hier mitunter miteinander. Innerhalb dieser Vesikel erfolgt eine Vermehrung der Bakterien, welche zur Ausbildung schlauchförmiger Lysosomen führt. Weitere Vermehrung innerhalb dieser Lysosomen führt zum Aufbrechen dieser Lysosomen und zur Zerstörung der Epithelzellen (FINLAY & SIEBERS 1995).

Symptome bei einer enteritischen Salmonellose sind Durchfälle, Übelkeit, Erbrechen sowie Fieber. Die Symptome klingen in der Regel nach ein paar Tagen von selbst ab. Nur bei älteren, immungeschwächten oder sonst anfälligen Menschen, wie Schwangeren oder Kindern, kann die enteritische Salmonellose zum Tode führen (MIMS ET AL., 1998).

### I.1.1.3. Salmonellosen bei Tieren:

Salmonellosen bei Tieren sind meist die Folge von Verabreichung kontaminierten Futters bzw. Trinkwassers sowie die Ausscheidungen bereits infizierter Tiere. Die Aufnahme der Keime erfolgt analog zum Menschen in der Regel oral. Der Infektionsweg verläuft wie bei menschlichen Salmonellosen über das Eindringen der Bakterien in das Dünndarmepithel bzw. via Makrophagen in das lymphatische System. Die primären Symptome einer Tiersalmonellose sind mit Fieber, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit (Inappetenz) und Durchfall denen einer enteritischen Salmonellose beim Menschen recht ähnlich. Sekundäre Effekte können aber auch Lymphknotenschwellungen, Affektionen der Luftwege, Gelenk- und Nabelentzündungen, Aborte aber auch Hoden- oder Hirnhautentzündung (Meningitis) sein. Bei chronischem Verlauf kann es zu Gewebenekrosen und anämischen Infarkten in Leber, Milz, Niere, Lunge und Knochenmark kommen. Der Tod tritt bei schwerem Krankheitsverlauf durch inneres Austrocknen (Exsikkose) und Blutvergiftung (Toxämie) mit Kreislaufversagen ein (BLOBEL & SCHLIEBER 1981).

*S. Typhimurium* zeigte sich in der Vergangenheit für die meisten bei Haustieren aufgetretenen Salmonellosen verantwortlich (BLOBEL & SCHLIEBER 1981). Zahlreiche ergänzend bei Infektionen aufgetretenen *Salmonella*-Serotypen zeigen eine gewisse Wirtsspezifität (RABSCH ET AL., 2002). So befällt *S. Choleraesuis* überwiegend Schweine, gelegentlich aber auch den Menschen. Bei Rindern spielt *S. Dublin* eine wesentliche Rolle als Krankheitserreger. *S. Abortusovis* ist ein schafspezifischer Serotyp, wohingegen *S. Abortusequi* ausschließlich bei Pferden vorkommt.

Salmonellosen bei Tauben werden zum überwiegenden Teil von *S. Typhimurium* variant Copenhagen verursacht. Der Unterschied dieses wirtsspezifischen Serotyps zum Serotyp *S. Typhimurium*, welcher sich durch geringe Wirtsspezifität auszeichnet, besteht im Fehlen des O-Antigens O5 (BLOBEL & SCHLIEBER 1981; RABSCH ET AL., 2002).

*S. Gallinarum-Pullorum* tritt hauptsächlich bei Hühnern auf, befällt aber auch andere Vögel. Dieser Serotyp stellt die einzige von vorneherein unbewegliche Variante von *S. enterica* subs. *enterica* dar und ist verantwortlich für die Kükenruhr bzw. für den Hühnertyphus. Der Serotyp *S. Gallinarum-Pullorum* wird vielfach in *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* unterteilt. Rein serologisch betrachtet besteht zwischen beiden Teilerotypen kein Unterschied. Jedoch lassen sich beide Teilerotypen anhand biochemischer, kulturmorphologischer und klinischer Merkmale voneinander abgrenzen. So kommt *S. Gallinarum* überwiegend bei erwachsenen Hühnern vor, *S. Pullorum* hingegen hauptsächlich bei Küken (BLOBEL & SCHLIEBER 1981).

Das Krankheitsbild, welches Serotypen mit hoher Wirtsspezifität hervorrufen, gleicht eher dem einer typhösen Salmonellose als dem einer selbstlimitierenden Gastroenteritis und ist daher deutlich schwerwiegender als jenes, welches auf Serotypen mit geringer Wirtsspezifität zurückzuführen ist. Die entsprechenden Stämme verhalten sich invasiv und verursachen schwere systemische Krankheiten (JONES ET AL. 2001; RÖMLING ET AL. 2003; UZZAU ET AL. 2001).

## I.1.2. Verschiedene krankheitserregende Formen von *Escherichia coli*:

### I.1.2.1. Extraintestinale Infekte:

Extraintestinale Infektionen entstehen immer dann, wenn wirtseigene Bakterienstämme an Körperstellen gelangen, wo sie normalerweise nicht vorkommen, aber vorübergehend günstige Wachstumsbedingungen vorfinden. Zu der Stammgruppe, welche extraintestinale Infekte hervorruft, gehören uropathogene *E. coli* (UPEC), *E. coli*-Stämme, die nosokomiale Sepsen verursachen (SEPEC), appendizitis-, peritonitis- und meningitisinduzierende Stämme sowie *E. coli*-Stämme aus Wund- und Galleninfekten.

Uropathogene *E. coli* induzieren entweder eine Entzündung der Harnröhre (Urethritis) oder der Blase (Zystitis), eine Urethrozystitis im unteren Bereich der Harnwege oder sie befallen sogar Nieren und Nierenbecken und verursachen hier eine gleichzeitige Entzündung von Blase und Niere (Zystopyelitis) oder lediglich der Niere (Pyleonephritis), hervorgerufen durch Polysaccharidantigene der äußeren Membran (K-Antigene; MIMS ET AL., 1998). Die Erreger wandern vom Ostium urethrae her die Harnröhre hinauf. UPEC-Stämme heften sich mit Pyleonephritis-assoziierten Pili (PAP; P-Fimbrien) bzw. Nicht-Fimbrien-Adhäsinen (NFA) spezifisch an Rezeptoren des Nierenbeckens an und produzieren das Hämolysin HlyA (KAYSER ET AL., 1998; MIMS ET AL., 1998). Hämolysine fungieren als membranzerstörende Toxine.

### I.1.2.2. Intestinale Infekte:

Zu den *E. coli*-Stämmen, die intestinale Infekte hervorrufen, gehören enteropathogene (EPEC), enterotoxische (ETEC), enteroinvasive (EIEC) und enterohämorrhagische (EHEC) bzw. verotoxinproduzierende (VTEC) *E. coli* (FARMER & KELLY 1991; KAYSER ET AL., 1998; MIMS ET AL., 1998). Auf diese *E. coli*-Stämme soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie im Verlauf dieser Arbeit keine Rolle spielen.

### I.1.3. Die Adhärenz als erster Schritt eines jeden Infektionszyklus:

Sowohl bei *E. coli* als auch bei *Salmonella* beginnt jeder Infektionszyklus mit der Anheftung der Bakterienzellen an Epithelzellen des Darmes bzw. des Harnleiters eines Wirtes. Bei den hierfür notwendigen Wechselwirkungen zwischen Bakterien- und Epithelzellen sind zahlreiche biochemische Faktoren sowie sich auf der Oberfläche der Bakterienzelle befindende proteinöse Strukturen wesentlich beteiligt. Die Adhäsion beginnt in der Regel damit, dass bakterieneigene Adhäsine mit spezifischen Rezeptoren der Wirtszelle interagieren (CHRISTENSEN ET AL., 1985). Die meisten Adhäsine gehören der Gruppe der Lektine an. Lektine sind proteinöse Filamente, die spezifisch bestimmte Saccharide binden können (VOET & VOET 1994). Viele dieser Adhäsine sind Fimbrien, lange proteinöse Filamente, die sich auf der Zelloberfläche der Bakterien befinden.

Bei *E. coli*-Stämmen spielen z. B. unter anderem Typ-1-, K88-, K99-, CFA/-, CFA/2-, 987P-, F41-, E8775- und P-Fimbrien bei der Anheftung eine Rolle, wobei jeder Fimbrientypus wirts- und gewebsspezifisch und in der Regel auch typisch für die Art der jeweiligen Infektion ist (CHRISTENSEN ET AL., 1985). So treten P-Fimbrien beispielsweise vorwiegend bei UPEC-Stämmen auf und binden spezifisch an  $\alpha$ -D-Gal(1-4)- $\beta$ -D-Gal-Moleküle (JOHNSON ET AL., 2000; MOBLEY ET AL., 1993; ROBERTS ET AL., 1997).

### I.1.4. EcoR- und LT-Sammlung:

Die EcoR-Sammlung (OCHMAN & SELANDER 1984) besteht aus 72 *E. coli*-Stämmen. Bei den meisten Stämmen handelt es sich um kommensale Fäkalstämme, die aus Ausscheidungen verschiedener Tiere wie Hunden aber auch Zootieren, z.B. Giraffen, Orang Utans, Leoparden, usw. sowie aus Fäkalien verschiedener Personen stammen. Elf der Isolate sind uropathogene *E. coli*-Stämme, die aus dem Urin weiblicher Personen isoliert wurden. Informationen bezüglich der einzelnen Stämme sind von der Internetseite des National Food Safety & Toxicology Centers der Michigan State University zu beziehen (s. Kapitel II.1.4.).

Die LT-Sammlung (LILLENGEN 1948) ist eine Sammlung, welche aus 21 pathogenen *S. Typhimurium*-Stämmen, LT 1 bis LT 21, besteht. Die meisten dieser Stämme stammen aus Ausscheidungen von diversen Personen, einige jedoch aus Ausscheidungen verschiedener Haustiere. Die Auswahl der Stämme erfolgte anhand ihres jeweiligen Lysotyps, d.h. anhand des Kriteriums, welche Phagentypen die jeweiligen Stämme befallen und lysieren können. Innerhalb der Sammlung ist jeder Lysotyp einmal vertreten.

## **I.2. Bakterielle Biofilme:**

Unter einem Biofilm versteht man eine Bakterienpopulation, welche durch eine extrazelluläre Matrix miteinander und mit dem Substrat, auf dem sich die Bakterien angesiedelt haben, verknüpft ist. An der Bildung eines Biofilms können einzelne aber auch viele verschiedene Bakterienspezies beteiligt sein. Ein Beispiel für einen Biofilm, der aus vielen verschiedenen Bakterienspezies gebildet wird, ist z.B. Zahnstein, wo bis zu 500 Bakterienspezies gefunden werden können (EVALDSON ET AL., 1982; PASTER ET AL., 2001; ROSAN & LAMONT 2000). Ein Biofilm mit einer einzigen Bakterienart liegt z.B. bei Patienten mit Zystischer Fibrose vor, wo eine Kolonisation der Lunge durch *Pseudomonas aeruginosa* vorliegt (COLEMAN ET AL., 2003; HASSAN ET AL., 1994; KRESSE ET AL., 2003). Weitere Spezies, die monospezielle Biofilme ausbilden, sind neben *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* auch viele grampositive Bakterienarten wie *Staphylococcus aureus* (BALABAN ET AL., 2003; VASUDEVAN ET AL., 2003) und *Staphylococcus epidermidis* (FITZPATRICK ET AL., 2002; LYTE ET AL., 2003).

### I.2.1. Welchen Nutzen haben Bakterien von der Biofilmbildung?

Im medizinischen Bereich bieten Biofilme Schutz vor Bioziden wie Antibiotika und Desinfektionsmitteln (ELVERS ET AL., 2002; GILBERT ET AL., 2002A und B; LUPPENS ET AL., 2002; MAIRA-LITRAN ET AL., 2000; WATTANAKAROON & STEWART 2000), da diese lediglich die äußeren Zellen eines Biofilms erreichen und abtöten können. Bei einer Änderung der Umweltbedingungen kann der Biofilm anschließend jederzeit wieder die Umgebung neu besiedeln. Darüber hinaus bietet die von Biofilmen exprimierte extrazelluläre Matrix Schutz vor harschen Umweltbedingungen. So konnten z.B. HODGES ET AL., 1991 nachweisen, dass selbstproduziertes Alginat Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa* vor bestimmten Antibiotika schützt (s. auch HASSET ET AL., 1999; JAIN ET AL., 2003).

In natürlicher Umgebung sind Vorteile, die Biofilmbildung mit sich bringt, Widerstandskraft gegen Strömungseffekte in Flusssystemen, Besetzen von ökologisch günstigen Nischen und in Fließsystemen ein gewisser Siebeffekt, der die Bakterien mit Nährstoffen versorgt (COSTERTON 1995).

Innerhalb eines Wirtes können Bakterien durch Biofilmbildung, z.B. auf klinischen Implantaten, der Immunabwehr trotzen, da sie im Zellverband schwerlich von Makrophagen phagozytiert werden können (ROZALSKA ET AL., 1996; SHIAU & WU 1998; SINGH ET AL., 2002). Im Darmlumen bewirkt das Ausbilden von schwerverdaulichen Klumpen möglicherweise eine längere Aufenthaltsdauer der Bakterien vor dem Ausscheiden mit dem Kot (ZOGAY ET AL., 2001).

### I.2.2. Was induziert Biofilmbildung?

Bei vielen Bakterienspezies einschließlich *S. Typhimurium* ist nachweislich Nährstoffmangel der Hauptauslöser für Biofilmbildung (GERSTEL & RÖMLING 2001; JAMES ET AL., 1995). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Hinweise, dass die Zelldichte des bewachsenen Mediums die Biofilmbildung fördert. Die Bakterien kommunizieren via „Quorum Sensing“ miteinander und induzieren so bei allen Zellen gleichzeitig Biofilmbildung. Als Botenstoff fungiert N-Acyl-Homoserinlacton (BATCHELOR ET AL., 1997; DE KIEVIT ET AL., 2001; EBERL 1999). In *Pseudomonas aeruginosa* hat allerdings das „Quorum Sensing“ keinen Einfluss auf die Biofilmbildung per se, wohl aber auf die Biofilmarchitektur (DAVIES ET AL., 1998).

### I.2.3. Wo sind Biofilme problematisch?

Im medizinischen Bereich bereiten bakterielle Biofilme von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* Probleme, wenn sie sich innerhalb von Kathethern (ANDREOLI-PINTO & GRAZIANO 1999; VOLKOW ET AL., 1997) oder auf implantierten Prothesen befinden (MONZON ET AL., 2001 und 2002; NGUYEN ET AL., 2002; VON EIFF ET AL., 2002; WILSON 2001). Das Immunsystem solcher Patienten ist geschwächt und so können diese Hautkeime z.B. problemlos durch Kathethereinstichstellen in die Blutbahn gelangen und sich auf den frischen Implantaten festsetzen. Hier entstehen dann Biofilme, die vom körpereigenen Immunsystem zwar angegriffen aber nicht erfolgreich bekämpft werden können. Die Folge sind schwere Entzündungen. Häufig muss das Implantat wieder entfernt werden, um den Entzündungsprozess zu stoppen (VAN DE BELT ET AL., 2001).

Ein anderes Bakterium, das häufig biofilmverursachte Infektionen auslöst, ist *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilme dieser Spezies sind die Ursache für eine oft jahrzehntelange Kolonisation der Lungen von Patienten, die unter Zystischer Fibrose leiden. Auch die aggressivsten Antibiotikabehandlungen sind nicht in der Lage, die Bakterien aus der Lunge zu entfernen (HASSAN ET AL., 1994; KRESSE ET AL., 2003).

Darüber hinaus sind bakterielle Biofilme in Lebensmittelverarbeitungs- bzw. Trinkwasseraufbereitungsanlagen problematisch. Haben sie sich erst einmal in den Rohrleitungssystemen, Transportcontainern oder in Verpackungen manifestiert, sind sie mit Antibiotika bzw. Detergentien kaum noch zu bekämpfen (BLUM ET AL., 1998; LE MAGREX-DEBAR ET AL., 2000; PARK ET AL., 2001; RAMESH ET AL., 2002).

## **I.3. Biofilmbildung bei *S. Typhimurium*:**

### **I.3.1. Wie kann bei *S. Typhimurium* Biofilmbildung induziert werden?**

Analog zu den *E. coli*-Stämmen MC4100 und Y-Mel sind die Hauptparameter, die bei den beiden *S. Typhimurium*-Stämmen ATCC14028-1s (UMR 1) und SR-11 Biofilmbildung induzieren, niedrige Temperatur, geringe Osmolarität, Eisenmangel und mikroaerophile Bedingungen (RÖMLING ET AL., 1998A und B). Biofilme werden bei den genannten Stämmen ausgebildet, wenn sie bei 28° C auf Agarplatten angezogen werden, die Luria-Bertoni-Medium (LB-Medium) enthalten, welchem kein Kochsalz beigelegt wurde. Erfolgt das Wachstum bei 37° C, so unterbleibt die Biofilmbildung. In Flüssigkultur wird bei den genannten Stämmen Biofilmbildung induziert, sofern die Flüssigkultur bei 28° C unter mikroaerophilen Bedingungen in LB-ohne-Salz-Medium angezogen wurde.

Nach wiederholten Subkultivierungen der Stämme SR-11 und ATCC14028-1s traten mit einer Häufigkeitsfrequenz von etwa 1:1000 bei beiden Stämmen Mutanten auf, bei denen die Biofilmbildung temperaturunabhängig erfolgte (RÖMLING ET AL., 1998B; SUKUPOLVI ET AL., 1997A). Geringe Osmolarität blieb jedoch auch bei diesen beiden Mutanten nach wie vor Voraussetzung für optimale Biofilminduktion.

### **I.3.2. Die vier Hauptphänotypen von *S. Typhimurium*:**

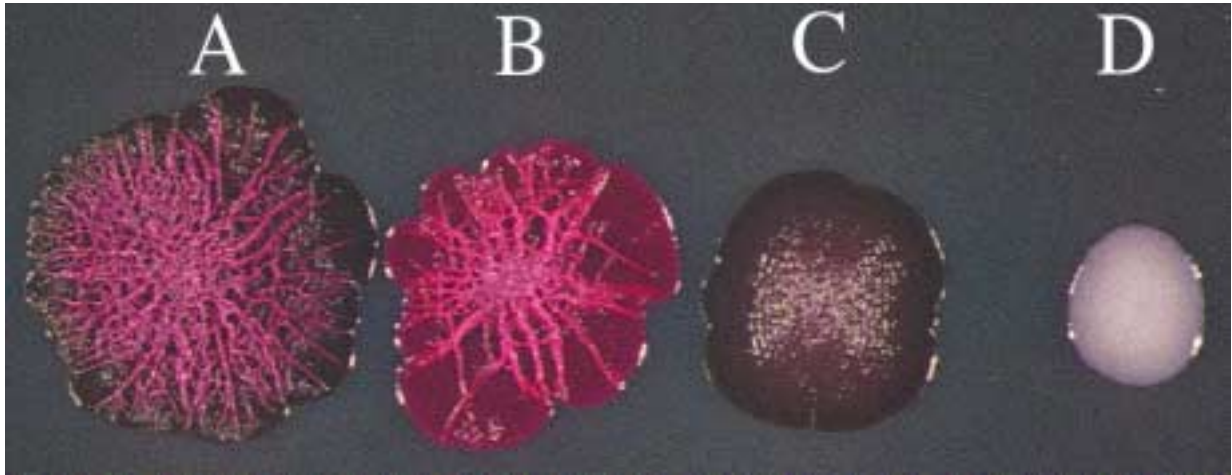
Kongorot (CR) ist ein Farbstoff, mit dem sich die Komponenten der extrazellulären Matrix von Biofilmen anfärben lassen. Je nach Zusammensetzung der Biofilmkomponenten bei den jeweiligen *S. Typhimurium*-Stämmen ergeben sich unterschiedliche Gestaltformen und Farben der Kolonien auf LB-ohne-Salz-Agarplatten, denen Kongorot beigelegt wurde. Die Abb. 1 zeigt die vier Standardphänotypen, die die unterschiedlichen extrazellulären Matrixkomponenten von *S. Typhimurium* ATCC14028 widerspiegeln.

Der Phänotyp rdar (red, dry and rough) stellt einen sehr festen und widerstandsfähigen Biofilm dar. Kolonien dieses Phänotyps lassen sich problemlos als zusammenhängendes Gewebe von einer Agarplatte abziehen. Der Phänotyp pdar (pink, dry and rough) hingegen hat eine eher gummiartige Konsistenz. Bdar (brown, dry and rough) wiederum stellt einen Phänotyp dar, der beim Abnehmen der entsprechenden Kolonie von der Agarplatte sich als krümelig erweist. Beim Vorliegen des Phänotyps saw (smooth and white) schließlich liegt keine Biofilmbildung vor. Mit diesem Phänotyp werden normale Einzelkolonien bezeichnet (s. hierzu RÖMLING ET AL., 1998A und B, 2000; ZOGAY 1999; ZOGAY ET AL., 2001).

### **I.3.3. Die Komponenten der extrazellulären Matrix:**

An der Bildung der extrazellulären Matrix eines *S. Typhimurium*-Biofilms sind im Wesentlichen zwei Komponenten maßgeblich beteiligt, nämlich eine, die von CR pink angefärbt wird und eine die eine braune Farbe aufweist. Überlagerung beider Komponenten ergibt die Färbung des rdar-Phänotyps.





**Abb. 1:** Die vier Hauptphänotypen von *S. Typhimurium* ATCC14028: **A:** rdar = red, dry and rough; **B:** pdar = pink, dry and rough; **C:** bdar = brown, dry and rough; **D:** saw = smooth and white

### I.3.3.1. Dünne aggregative Fimbrien:

Dünne aggregative Fimbrien sind proteinöse Filamente, welche sich auf der Bakterienoberfläche befinden. Sie sind in der äußeren Bakterienzellwand verankert und haben einen Durchmesser von 2 – 4 nm bei einer Länge von bis zu mehreren tausend nm (COLLINSON ET AL., 1999). Die Funktion dieser Fimbrien besteht – analog zu der anderer Fimbrientypen – in der Herstellung von Zell-Zell- bzw. Zell-Oberflächen-Kontakten (COSTERTON ET AL., 1987). Dünne aggregative Fimbrien werden sowohl von *Salmonella* als auch von *E. coli* exprimiert (RÖMLING ET AL., 1998A, B und 2000). Sie stellen die Biofilmkomponente dar, welche für die braune Färbung der Kolonien auf CR-Platten verantwortlich ist (COLLINSON ET AL., 1993; ZOGAY ET AL., 2001). Dünne aggregative Fimbrien werden bei *E. coli* als Curli bezeichnet (RÖMLING ET AL., 1998A). Der Einheitlichkeit halber wird im Folgenden der Passus „dünne aggregative Fimbrien“ für die entsprechenden Organellen beider Spezies verwendet.

Es ist bekannt, dass dünne aggregative Fimbrien mit zahlreichen eukaryotischen Proteinen, z.B. extrazellulären Matrixkomponenten eukaryotischer Zellen wie Fibronektin und Laminin interagieren können (BEN NASR ET AL., 1996; COLLINSON ET AL., 1993; OLSEN ET AL., 1989; SJÖBRING ET AL., 1994). Darüber hinaus binden dünne aggregative Fimbrien auch an abiotische Oberflächen wie Glas und Polystyrol und tragen somit zur Biofilmbildung bei (RÖMLING ET AL., 1998B).

Das Besondere an dünnen aggregativen Fimbrien ist, dass sie sehr stabil sind. Nur durch Behandlung mit konzentrierter Ameisensäure können die Fimbrienpolymere in ihre Untereinheiten aufgespalten werden (COLLINSON ET AL., 1996 und 1999).

Dünne aggregative Fimbrien stellen Polymere aus AgfA-Untereinheiten dar (COLLINSON ET AL., 1996 und 1999; RÖMLING ET AL., 1998A). Das funktionelle AgfA ist ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 17 kDa (COLLINSON ET AL., 1996 und 1999). AgfB fungiert als Nukleator der dünnen aggregativen Fimbrien und dient der Befestigung derselben in der äußeren Zellmembran. Dieses Protein ist dem AgfA homolog und ist in geringen Mengen auch entlang der Filamente nachweisbar (RÖMLING ET AL., 1998A).

Beide Proteine werden bei *E. coli* mit CsgA bzw. CsgB bezeichnet (RÖMLING ET AL., 1998A). Im Verlauf dieser Arbeit wird für die Proteine ebenfalls eine einheitliche Bezeichnung mit AgfA bzw. AgfB erfolgen.

### I.3.3.2. Zellulose:

Die zweite Komponente der extrazellulären Matrix, welche die Pinkfärbung der Kolonien verursacht, ist Zellulose (RÖMLING ET AL., 2000; ZOGAY ET AL., 2001). Zellulose ist ein  $\beta$ -1-4-Glukan, besteht also nur aus Glukose. Elastische Zellulosefibern verbinden benachbarte Zellen eines Biofilms miteinander und tragen so zur Stabilität des Biofilms bei. Auch die Resistenz gegenüber dem Desinfektionsmittel Hypochlorid konnte der Zellulose zugeschrieben werden (SOLANO ET AL., 2002). Die Funktion im Zusammenhang mit Infektionszyklen bei *E. coli* und *Salmonella* ist jedoch bislang noch unklar.

Allerdings gibt es andere Bakterienspezies, bei denen die Funktion der Zelluloseproduktion aufgeklärt werden konnte. So dient Zellulose bei leguminoseninfizierenden Bakterien wie *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosorum* der Adhärenz bzw. unterstützt das Eindringen in die Wurzelhaare der Wirtspflanzen (MATTHYSSE 1983; RICHTER 1988; RÖMLING ET AL., 2002). Möglicherweise spielt Zellulose im Infektionsverlauf ebenfalls bei der Adhärenz der Bakterien an das Wirtsgewebe eine Rolle.

### I.3.4. Die zur Biofilmbildung führende Regulationskaskade:

In die zur Biofilmbildung führende Regulationskaskade sind neben dem bivalenten *agfDEFG-agfBAC*-Operon und dem *bcsABZC*-Operon (bacterial cellulose synthesis) auch Transkriptionsfaktoren wie OmpR, der Sigmafaktor  $\sigma^S$  und *adrA* involviert. Alle genannten Gene bzw. Operons kommen sowohl bei *E. coli* als auch bei *Salmonella* vor. Die einzelnen Zusammenhänge innerhalb der Biofilmregulationskaskade sind im Folgenden dargestellt.

#### I.3.4.1. Das bivalente *agfDEFG-agfBAC*-Operon:

Dünne aggregative Fimbrien werden von zwei *agf*-Operons (aggregative fimbriae) kodiert, nämlich dem *agfDEFG*- und dem *agfBAC*-Operon. Die Transkriptionsstartpunkte der beiden *agf*-Operons liegen bei *E. coli* K-12 513 Basen bei *S. Typhimurium* LT 2 521 Basen voneinander entfernt auf dem Bakterienchromosom und werden in Gegenrichtung transkribiert (HAMMAR ET AL., 1995; RÖMLING ET AL., 1998A).

Das *agfBAC*-Operon kodiert für die Strukturproteine der dünnen aggregativen Fimbrien. AgfA stellt - wie bereits erwähnt - die Hauptkomponente der dünnen aggregativen Fimbrien dar. AgfB fungiert als Nukleator, welcher die dünnen aggregativen Fimbrien in der äußeren Zellmembran verankert. Darüber hinaus ist es in geringen Mengen auch entlang dieser Filamente nachweisbar (RÖMLING ET AL., 1998A). Die Funktion von AgfC ist bislang noch unklar. Die Transkription des *agfBAC*-Operons ist zu 100 % abhängig von AgfD, einem Produkt des *agfDEFG*-Operons.

AgfD ist ein transkriptionelles Regulatorprotein, welches der LuxR- bzw. UhpA (FixJ)-Proteinfamilie angehört (HAMMAR ET AL., 1995; RÖMLING ET AL., 1998A; RÖMLING ET AL., 2000). AgfG, ein Lipoprotein der äußeren Bakterienmembran, verhindert den proteolytischen Abbau der Komponenten der dünnen aggregativen Fimbrien, AgfA und AgfB (LOFERER ET AL., 1997; RÖMLING ET AL., 1998A). Die Funktionen von AgfE und AgfF sind noch nicht vollständig aufgeklärt. AgfE ist für die Fibronektin- und CR-Bindungseigenschaften der dünnen aggregativen Fimbrien verantwortlich, beeinflusst jedoch nicht deren Polymerisation (CHAPMAN ET AL., 2002). AgfF scheint im Nukleationsprozess zwischen AgfB und AgfA eine Rolle zu spielen. So zeigten *agfF*-Mutanten von *E. coli* trotz des Vorhandenseins von AgfA im Wachstumsmedium eine starke Beeinträchtigung der Nukleationsfunktion (CHAPMAN ET AL., 2002).

Die Transkription des *agfDEFG*-Operons wird zu 100 % durch OmpR (Outer membrane protein Regulator) positiv reguliert (HULTGREN ET AL., 1996; RÖMLING ET AL., 1998A, B und

2000). OmpR ist ein transkriptioneller Regulator, welcher durch die Sensorhistidinkinase EnvZ phosphoryliert bzw. dephosphoryliert wird (PRATT & SILHAVY 1995).

Ein weiterer Faktor, von dem die Transkription des *agfDEFG*-Operons abhängig ist, ist der Sigmafaktor RpoS (RÖMLING ET AL., 1998A und B), welcher zahlreiche Gene reguliert, die vor allem in der stationären Wachstumsphase oder unter Stressbedingungen exprimiert werden (FANG ET AL., 1992; HENGGE-ARONIS 2002; MC CANN ET AL., 1991). Diese Abhängigkeit des *agfDEFG*-Promotors von  $\sigma^S$  beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass H-NS (Histone-like protein S) eine  $\sigma^D$  – abhängige Transkription effizient unterbindet. Kann H-NS nicht exprimiert werden, so ist die Transkription vollständig unabhängig von  $\sigma^S$  (ARNQUIST ET AL., 1994; HAMMAR ET AL., 1995).

#### I.3.4.2. Das *bcsABZC*-Operon:

Dieses Operon, welches an einer anderen Stelle des Bakterienchromosoms als das bivalente *agfDEFG-agfBAC*-Operon liegt, ist zwischen zahlreichen Bakterienspezies hochkonserviert, z.B. *Gluconacetobacter xylinus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Klebsiella pneumoniae* sowie diversen Cyanobakterien (RÖMLING 2002). Die Produkte des *bcsABZC*-Operons dienen – wie die Bezeichnung *bcs* (bacterial cellulose synthesis) bereits andeutet - der Zelluloseproduktion. Bei BcsA handelt es sich um eine Zellulosesynthase. BcsB stellt ein c-di-GMP-bindendes Protein dar. Das *bcsZ*-Gen kodiert für eine Zellulase, welche ebenfalls zur Zelluloseproduktion benötigt wird (RÖMLING 2002). BcsC schließlich wird zumindest in vivo nicht aber in vitro bei einigen Enterobacteriaceen und Pseudomonaden zur Zelluloseproduktion gebraucht (RÖMLING 2002).

Die Transkription des *bcsABZC*-Operons erfolgt unabhängig von AgfD (RÖMLING 2002; ZOGAY ET AL., 2001).

#### I.3.4.3. Das *adrA*-Gen:

Dieses Gen, welches bei *E. coli* mit *yaiC* bezeichnet wird, beginnt bei Basenpaar 438110 und reicht bis Basenpaar 439241 auf dem sequenzierten *S. Typhimurium* LT 2-Chromosom und ist somit weder dem *bcsABZC*- noch dem bivalenten *agfDEFG-agfBAC*-Operon benachbart. Die Länge des entsprechenden Leserahmens beträgt 1113 bp. Der Translationsstart des stromauf angrenzenden *psiF*-Gens liegt mit 105 Basen relativ weit vom Translationsstart des *adrA*-Gens entfernt. Das stromab gelegene *proC*-Gen, welches lediglich 14 Basen vom Ende des *adrA*-Gens entfernt liegt, wird in Gegenrichtung zu diesem transkribiert.

Das *adrA*-Gen hat eine Vermittlerfunktion zwischen Transkription des *agfDEFG*-Operons und der Produktion von Zellulose. Die Transkription des *adrA* ist zu 100 % abhängig von AgfD (RÖMLING ET AL., 2000) und nur wenn AdrA exprimiert wird, kommt es zur Bildung von Zellulose.

Die genaue Funktion des AdrA-Proteins ist noch unklar. Eindeutig ist, ausgehend von der Sequenz dieses Genes und entsprechenden Experimenten, dass AdrA kein transkriptioneller Regulator ist. Zugleich wurde gezeigt, dass das *bcsABZC*-Operon unabhängig von *agfD* und somit auch unabhängig von *adrA* exprimiert wird (RÖMLING ET AL., 2000; ZOGAY ET AL., 2001). Anzunehmen ist, dass das AdrA Protein mit einem oder mehreren Produkten des *bcsABZC*-Operons interagiert und so die Produktion von Zellulose steuert.

Das AdrA ist ein Protein, welches aus 371 Aminosäureresten besteht und eine relative Molekülmasse von 41,5 kDa hat. Laut Computerprogrammvorhersagen ist das AdrA in der inneren Zellmembran lokalisiert (RÖMLING ET AL., 2000; RÖMLING 2002). Es lässt sich in einen überwiegend hydrophoben N-Terminus von etwa 190 Aminosäuren mit vier bis fünf Transmembrandomänen und einen C-Terminus von etwa 181 Aminosäuren, welcher vermutlich eine zytosolische Effektdomäne des Proteins darstellt, einteilen. Die vermutliche zytosolische Domäne enthält eine hochkonservierte GGDEF-Domäne, die in über 200

Proteinen unterschiedlicher Funktion bei zahlreichen gramnegativen und grampositiven Bakterienspezies vorkommt (RÖMLING ET AL., 2000). Beispiele hierfür liefern die Phosphodiesterase A1 (PDEA1) und die Diguanylatzyklase 1 (DGC1) von *Gluconacetobacter xylinus* (TAL ET AL., 1998; RÖMLING 2002; RÖMLING ET AL., 2000), CelR2, ein Regulatorprotein, das die Zelluloseproduktion bei *Rhizobium leguminosorum* bv. *trifolii* steuert (AUSMEES ET AL., 1999) sowie PleD, ein Response-Regulator, der die Umwandlung von Schwärm- zu Stielzellen im Verlauf des Zellzyklus bei *Caulobacter crescentus* steuert (HECHT & NEWTON 1995).

Die genaue Funktion der GGDEF-Domäne ist bislang noch unklar. Es gibt jedoch Hinweise, die darauf hindeuten, dass diese Domäne c-di-GMP bindet bzw. produziert und dadurch die Zelluloseproduktion aktiviert (RÖMLING 2002). Hohe Übereinstimmung ihrer Sequenz mit der eukaryotischer Adenylat-Zyklase impliziert, dass die ihre Funktion die einer Nukleotid-Zyklase ist (PEI & GRISHIN 2001). Möglicherweise steuert AdrA die Zellulosesynthese über die Bindung bzw. Produktion von c-di-GMP. Bei *Gluconacetobacter xylinus* konnte eine Steuerung der Zellulosesynthese via c-di-GMP bereits nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass hier c-di-GMP als allosterischer Aktivator der Zellulosesynthase BcsA fungiert (ROSS ET AL., 1987).

#### I.3.4.4. Abweichungen von der Regulationskaskade:

Mit einer Auftrittshäufigkeit von 1:1000 traten bei den beiden *S. Typhimurium*-Stämmen SR-11 und ATCC14028-1s Mutanten auf, deren *agfD*-Promotor temperaturunabhängig exprimiert wird (RÖMLING ET AL., 1998B; SUKUPOLVI ET AL., 1997A). Als Ursache hierfür wurde in beiden Fällen eine Punktmutation im Promotorbereich des *agfD* festgestellt. Bei *S. Typhimurium* SR-11b, der entsprechenden Mutante des *S. Typhimurium*-Stammes SR-11, liegt an Position –44 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des *agfD* ein Basenaustausch von Guanin nach Thymin vor. Im Fall von *S. Typhimurium* ATCC14028-4r, der Mutante von *S. Typhimurium* ATCC14028-1s, wurde eine Baseninsertion, ein Thymin, an Position –17 aufgedeckt (RÖMLING ET AL., 1998B). Beide Mutationen führen zu einer Unabhängigkeit der Transkription des *agfD* von  $\sigma^S$ . Der Promotor des *agfD*-Gens dieser Mutanten scheint somit von  $\sigma^D$  erkannt zu werden (RÖMLING ET AL., 1998B).

Durch Allelaustausch wurde die intergenische Region zwischen *agfDEFG*- und *agfBAC*-Operon des Stammes ATCC14028-4r mit der Baseninsertion im *agfD*-Promotor (Promotor *PagfD1*) in das Chromosom des Stammes ATCC14028-1s eingebracht, woraus Stamm MAE 52 resultierte (RÖMLING ET AL., 1998B).

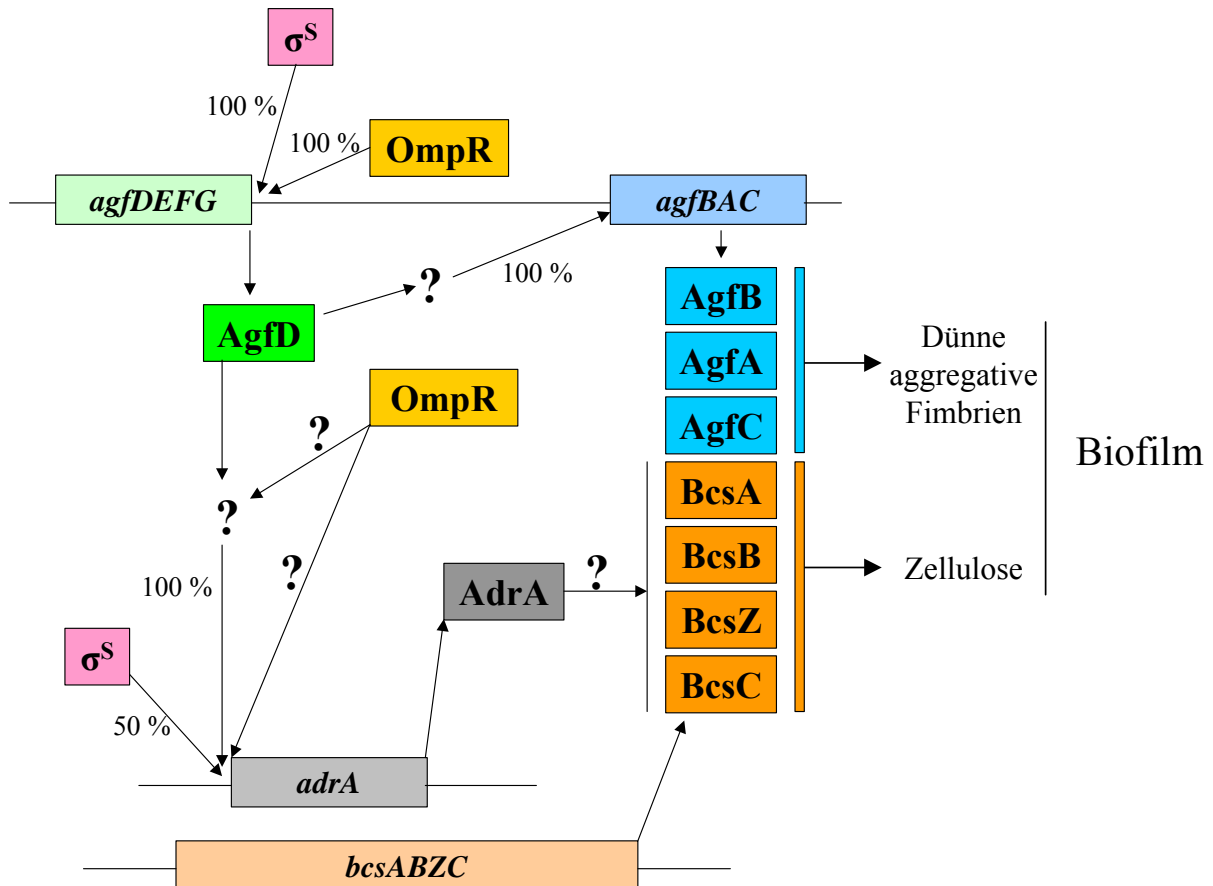
### **I.4. Ziele der Arbeit:**

Zu Beginn der Arbeit war ein Teil der Regulationskaskade, welche zur Biofilmbildung bei *Salmonella Typhimurium* ATCC14028-1s durchlaufen wird, bereits bekannt. Diese ist zusammen mit unbekannten Teilen in Abb. 2 dargestellt.

Bei niedriger Temperatur und Osmolarität aktiviert OmpR in der stationären Wachstumsphase den *agfD*-Promotor. Anschließend erfolgt eine  $\sigma^S$ -abhängige Transkription des *agfDEFG*-Operons. Als Hauptregulator der Biofilmbildung aktiviert AgfD dann den Promotor des *agfBAC*-Operons, was zur Ausbildung von dünnen aggregativen Fimbrien führt. Darüber hinaus aktiviert AgfD auch *adrA*, dessen Transkription anschließend zu 50 % ebenfalls von  $\sigma^S$  abhängig ist. AdrA tritt anschließend direkt oder indirekt mit den Produkten des *bcsABZC*-Operons in Wechselwirkung um die Zelluloseproduktion zu aktivieren.

Viele Fragestellungen bezüglich der Regulationskaskade, die zur Biofilmbildung führt, waren noch offen und sollten im Verlauf dieser Arbeit aufgeklärt werden. So war beispielsweise noch unbekannt, ob nach der Transkription des *agfD* in einem oder mehreren zusätzlichen Schritten OmpR für die Zellulosebiosynthese benötigt wird. Ebenfalls unbekannt war, ob nach erfolgter

Transkription des *adrA*  $\sigma^S$  weiterhin für die Expression von Zellulose von Bedeutung ist (vgl. Abb. 2). Für das *adrA*-Gen sollte geklärt werden, ob *adrA* möglicherweise analog zu den anderen an der Biofilmbildung beteiligten Genen Bestandteil eines Operons ist. Desweiteren sollte der Transkriptionsstart des *adrA*-Gens ermittelt werden, um durch einen Vergleich der Promotorregionen von *agfBAC* und *adrA* als zwei von AgfD abhängigen Promotoren eventuell bestehende Gemeinsamkeiten aufdecken zu können. Bestehende Gemeinsamkeiten von beiden Promotoren würden darauf hindeuten, dass AgfD direkt an die DNS der entsprechenden Regionen bindet und nicht indirekt deren Induktion bewirkt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob eine Abhängigkeit der Transkription des *adrA*-Gens von Produkten des *agfBAC*-Operons besteht.



**Abb. 2:** Regulationskaskade, die bei *S. Typhimurium* ATCC14028-1s zur Biofilmbildung führt: Ungeklärte Schritte sind mit einem Fragezeichen versehen. Erklärungen zu den einzelnen Komponenten der Kaskade befinden sich im Text.

Eine weitere Fragestellung war, ob die Regulationskaskade des Stammes *Salmonella* Typhimurium ATCC14028-1s mustergültig für Biofilmbildung bei *Salmonella enterica* allgemein ist. Mittels Phagentransduktionsexperimenten, bei denen bei epidemiologisch nicht verwandten *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis*-Wildtypstämmen gezielt Schlüsselgene der Regulationskaskade ausgeschaltet werden sollten, sollte dieser Fragestellung nachgegangen werden.

Dünne aggregative Fimbrien und Zellulose konnten in der Vergangenheit als Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix eines Biofilms der *Salmonella* Typhimurium Stämme ATCC14028-1s und SR-11 nachgewiesen werden (RÖMLING ET AL., 1998A, B und 2000; ZOGAY ET AL., 2001). Eine interessante Frage war nun, inwieweit diese Organellen auch bei Biofilmen diverser Wildtypstämme verschiedener *Salmonella*- und *E. coli*-Serotypen eine Rolle spielen. Da anzunehmen war, dass dünne aggregative Fimbrien und möglicherweise auch

Zellulose im Infektionsverlauf von pathogenen Stämmen andere Funktionen wahrnehmen als im Lebenszyklus kommensaler darmbewohnender Stämme, sollten die Expression dieser Biofilmkomponenten bei frisch isolierten uropathogenen und kommensalen *E. coli*-Stämmen untersucht und die Ergebnisse einander gegenübergestellt werden.

Zahlreiche *Salmonella*-Serotypen wie *S. Typhi* zeichnen sich durch eine hohe Wirtsspezifität aus (RABSCH ET AL., 2002). Andere wie *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* kommen sowohl bei verschiedenen Wirten als auch in der Umwelt, in verdorbenen Lebensmitteln und im Trinkwasser vor (GUGNANI 1999; THORNS 2000). Da dünne aggregative Fimbrien und möglicherweise auch Zellulose immunogene Komponenten darstellen (SAKELLARIS ET AL., 2000; SUKUPOLVI ET AL., 1997A), waren Unterschiede im Grad der Ausprägung dieser beiden Bestandteile der extrazellulären Matrix bei Serotypen mit hoher und Serotypen mit geringer Wirtsspezifität zu erwarten. Deswegen sollten der Grad der Expression dünner aggregativer Fimbrien und Zellulose bei Vertretern beider Gruppierungen ermittelt und die entsprechenden Resultate miteinander verglichen werden.

## II. Material und Methoden:

### II.1. Allgemeines:

#### II.1.1. Geräte:

Autoklaven:	HST 4-5-6; Zirbus Sauter
Apparatur für Northern Blotting:	Biorad
Blotkammern für Western Blotting:	Phase
Brutschränke:	Heraeus
Digitalkamera:	Camedia C-3030 Zoom; Olympus
DNS-Elektrophoresekammern:	Horizon 58; Life Technologies Wide Mini Sub <sup>TM</sup> Cell; Biorad Mini Sub Cell GT; Biorad Sub Cell; Biorad HE99X-15-1.5; Pharmacia Biotech
Elektroporator:	Gene Pulser + Pulse Controller Plus; Biorad
ELISA-Reader:	Spectramax 250; MWG Biotech AG
Entwicklermaschine:	Urx 60; Agfa
French-Press:	Sim Aminco; Spectronic Instruments
Gaschromatograph/ Massenspektrometer (GC/MS):	GCQ Ion Trap Mass Spectrometer; Finnigan; ausgerüstet mit einer 30 m DB5 Kapillarsäule (Innendurchmesser: 0,25 mm; Trägergas Helium)
Gefrierschränke (-70° C):	VIP Series; Sanyo
Geltrockner:	Biotec Fischer
Heizblöcke:	Anachem 1202; Anachem House Thermostat 5320; Eppendorf Thermomixer 5436; Eppendorf Thermomixer Comfort; Eppendorf
Hybridisierungsöfen:	Micro 4; Hybaid

Kamera für Gele:	E.A.S.Y.; Herolab
Kamera für Platten:	Reprostar II; Camag + WV-BM 900 Monitor; Panasonic
Lyophyle:	Alpha 1-2; Christ
MALDI/TOF-MS:	Reflex <sup>TM</sup> MALDI/TOF; Bruker-Franzen
PCR-Thermocycler:	Varius V; Landgraf T3 Thermocycler; Biometra T Gradient; Biometra UNO II; Biometra
Phosphoimager:	BAS-2500; Fujifilm
Photometer:	Spectro 4053 Kinetics; LKB Biochrom Spectro U-2000; Hitachi Spectronic 20 Genesys <sup>TM</sup> ; Spectronic Instruments Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech Biophotometer; Eppendorf
Rundlaufinkubator:	TC-7 in WB120; New Brunswick Scientific Co. Inc
Schüttelinkubatoren:	HT Infors Multitron; Infors
Schüttler:	GFL 3016; BLB WT 12; Biometra
SDS-PAGE-Kammern:	Minigel Twin; Biometra Minigel G 41; Biometra
Sequenziergelkammer:	Roth
Sequenziergerät:	Perkin Elmer
Sterilarbeitsbank:	Sterilguard III; Advance
Transformatoren:	Standard Power Pack P 25, Biometra EPS 600; Pharmacia Biotech ÊPS 3501; Pharmacia Biotech LKB-GPS 200/400; Pharmacia Biotech Power Pack 300; Biorad
Ultraschallgerät:	Sonifier 250; Branson



Ultrazentrifugen:	Optima TLX; Beckmann LS-50 M/E; Beckmann
UV-Tisch:	Intas 302; Polaroid
Vakuumtrockner:	SpeedVac Concentrator; Bachofer Concentrator 5301; Eppendorf
Zentrifugen:	Centrifuge 5402; Eppendorf Centrifuge 5403; Eppendorf Centrifuge 5415 C; Eppendorf Biofuge A; Heraeus Biofuge 13; Heraeus Megafuge 3.0R; Heraeus Centrifuge J2-HS; Beckmann Centrifuge J2-21; Beckmann Avanti J-25; Beckmann SC-5B; Sorvall

### II.1.2. Kooperationspartner:

- 1.) Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger; Robert-Koch-Institut - Bereich Wernigerode; Postfach; D-38843 Wernigerode
- 2.) Institut für Mikrobiologie im Städtischen Klinikum Braunschweig; Celler Straße

### II.1.3. Computerprogramme:

MS Office 1997 und 2000  
Paint Shop Pro 6.0  
Adobe Photoshop 5.0  
Genetics Computer Group (GCG)  
Olympus Camedia Master 2.0  
Chromas 1.45 (32-bit)  
DNASTar-EditSeq 4.00  
Bruker Data Analysis 1.6g  
Aida Image Analyser 3.21

### II.1.4. Internetadressen für Sequenzvergleiche und Literatursuche:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

National Center for Biotechnological Information (NCBI)

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

Baylor College of Medicine HGSC (BCM)

<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>

EMBL-EBI; European Bioinformatics Institute

<http://www.expasy.ch/tools/>

Expaty Molecular Biology Server; Swiss Institute of Bioinformatics

<http://www.sanger.ac.uk/projects/>

Sanger Center UK

<http://www.atcc.org/>

American Type Culture Collection (ATCC)

<http://www.dsmz.de/>

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

<http://www.gatc.de/>

GATC Biotech AG

<http://foodsafety.msu.edu/whittam/#cultures> National Food Safety & Toxicology Center,  
Michigan State University; Microbial Evolution  
Laboratory: *E. coli*-Stammsammlungen (EcoR)

## II.2. Chemikalien:

Alle Chemikalien und Medienbestandteile hatten den Reinheitsgrad „p.a.“ und wurden ausnahmslos von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia, Bio101, Biolabs, Biorad, Boehringer Mannheim, Carl Roth GmbH & Co, Difco, Eurogentec, Fluka, Hoechst, Life Technologies, Maschery-Nagel, Merck, Millipore, MoBiTec, Novex, Oxoid, PeqLab, Promega, Qiagen, Ridet-de Haen, Serva und Sigma. Wenn nicht anders angegeben, so wurden alle Lösungen mit Wasser angesetzt. Wasser wurde ausschließlich in deionisierter Form (zweifach destilliert) verwendet. Sterilisation erfolgte in der Regel mittels Autoklavieren. Hierfür wurden die Lösungen und Festbestandteile für 30 min auf 121° C erhitzt. In den Fällen, in denen Lösungen sterilfiltriert wurden, fanden Filter der Firma Pall Gelman Laboratory mit einer Porengröße von 0,2 µm Anwendung.

## II.3. Rezepte für Standardmedien:

### II.3.1. Flüssigmedien und Agarplatten:

#### Luria-Bertani-Medium (LB):

Bacto-Trypton	10	g
Bacto-Hefeextrakt	5	g
NaCl	7	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

Sterilisation durch Autoklavieren

#### LB-Medium ohne Salz:

Bacto-Trypton	10	g
Bacto-Hefeextrakt	5	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

Sterilisation durch Autoklavieren

#### LB-Medium + EGTA (1,2-Bis-[2-aminoethoxyethan]-N,N,N',N'-tetraacetat): LB-Medium + 10 mM EGTA

Die 1 M EGTA-Lösung wurde zuvor autoklaviert.

#### SOB-Medium:

Bacto-Trypton	20	g
Bacto-Hefeextrakt	5	g
NaCl	0,6	g
KCl	0,19	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

Sterilisation durch Autoklavieren

SOC-Medium:

SOB-Medium

MgCl<sub>2</sub> 10 mMMgSO<sub>4</sub> 10 mM

Glukose 20 mM

Die Glukoselösung wurde sterilfiltriert, die Salzlösungen autoklaviert.

5 x M9-Minimalmedium:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 37,6 gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 gNH<sub>4</sub>Cl 5 g

NaCl 2,5 g

H<sub>2</sub>O ad 1 l

Sterilisation durch Autoklavieren

LB-Agar:

Bacto-Trypton 10 g

Bacto-Hefeextrakt 5 g

NaCl 7 g

Bacto-Agar 15 g

H<sub>2</sub>O ad 1 l

Sterilisation durch Autoklavieren

LB-ohne-Salz-Agar:

Bacto-Trypton 10 g

Bacto-Hefeextrakt 5 g

Bacto-Agar 15 g

H<sub>2</sub>O ad 1 l

Sterilisation durch Autoklavieren

Kongorot (CR)-Agarplatten:

LB-ohne-Salz-Agar 500 ml

Kongorot-Lösung 10 ml

Kongorot-Lösung:

Kongorot (CR) 2 mg/ml

Brilliant-Blue-G 1 mg/ml

beides zusammen gelöst in 70 % Ethanol

LB-Schwimm-Agar (0,3 %):

Bacto-Trypton 10 g

Bacto-Hefeextrakt 5 g

NaCl 7 g

Bacto-Agar 3 g

H<sub>2</sub>O ad 1 l

Sterilisation durch Autoklavieren

TOP-Agar:

Bacto-Agar	7	g
LB-Medium	ad 1	l
Sterilisation durch Autoklavieren		

Cled-Agar:

Cled-Agar	50	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l
Sterilisation durch Autoklavieren		

Mac-Conkey-Agar + Lactose (Mac-Lac):

Mac-Lac-Agar	50	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l
Sterilisation durch Autoklavieren		

EBU-Agar:

Bacto-Trypton	10	g
Bacto-Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
Glukose	2,5	g
Bacto-Agar	15	g
H <sub>2</sub> O	960	ml
Sterilisation durch Autoklavieren		

EBU-Agarplatten:

EBU-Agar	500	ml
1 % Evans-Blue-Lösung	0,625	ml
1 % Fluorescein-Lösung	1,25	ml
12,5 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung	20	ml

Die Farbstofflösungen wurden sterilfiltriert, die Salzlösung und der Agar autoklaviert.

Calcofluor (CF; 0,05 mM)-Platten:

LB-ohne-Salz-Agar	500	ml
50 mM Calcofluor	0,5	ml

Die Farbstofflösung wurde vorher sterilfiltriert, der Agar autoklaviert.

2,2-Dipyridyl (0,2 mM)-Agarplatten:

LB-ohne-Salz-Agar	500	ml
100 mM 2,2-Dipyridyl	1	ml

Die Chelatorlösung wurde zuvor sterilfiltriert.

M9-Minimalmedium-Agarplatten:

Bacto-Agar	7,5	g
H <sub>2</sub> O	400	ml
Sterilisation durch Autoklavieren		
anschließend Zugabe von:		
M9-Minimalmedium (5x)	100	ml
1 M MgSO <sub>4</sub> -Lösung	0,5	ml
1 M Glukose-Lösung	10	ml

Thiamin-Lösung (10 mg/ml)	25	µl
1 M CaCl <sub>2</sub> -Lösung	135	µl

Die Glukoselösung wurde sterilfiltriert, die Salzlösungen autoklaviert.

#### X-Gal-Indikatorplatten (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galaktosid):

LB-ohne-Salz-Agar	
X-Gal	40 mg/l

Folgende Stammlösung wurde hierfür hergestellt: 20 mg/ml X-Gal gelöst in N,N-Dimethylformamid.

### II.3.2. Standardpuffer und Lösungen:

#### 10 x PBS:

KCl	19,76	g
NaCl	80,06	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,04	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,65	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

Sterilisation durch Autoklavieren

## **II.4. Stämme und Stammsammlungen:**

### II.4.1. Verwendete Stämme:

Die folgenden beiden Tabellen Tab. 1 und 2 geben Aufschluss über Genotyp und Phänotyp der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, wobei zwischen Expressionsstämmen und Hilfsstämmen unterschieden wird.

**Tab. 1:** Für Genexpressionsstudien und Phagentransduktion verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Phänotyp (28° C/37° C)	Referenz
<i>S. Typhimurium</i>	UMR 1	ATCC 14028-1s; NaI <sup>r</sup>	rdar/saw	RÖMLING ET AL., 1998A
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 28	UMR 1 <i>ΔagfD101::Km<sup>r</sup></i>	saw/saw	RÖMLING ET AL., 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 42	SF 1005 x MAE 52; MAE 52 <i>rpoS::pRR10</i> ( <i>ΔtrfA</i> ); Amp <sup>r</sup>	bdar/bdar	RÖMLING ET AL., 1998B
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 49	UMR 1 <i>PagfD2</i> <i>ΔompR101::Amp<sup>r</sup></i>	saw/saw	RÖMLING ET AL., 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 50	UMR1 <i>ΔagfD101</i>	saw/saw	unveröffentlicht
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 51	UMR 1 <i>PagfD2</i> <i>ΔagfD101</i>	saw/saw	RÖMLING ET AL., 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 52	UMR 1 <i>PagfD1</i>	rdar/rdar	RÖMLING ET AL., 1998B
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 97	MAE 52 <i>ΔagfBA102</i>	pdar/pdar	RÖMLING ET AL., 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 103	MAE 52 <i>agfBA102</i> <i>adrA101::MudJ</i> ; Km <sup>r</sup>	saw/saw	RÖMLING ET AL., 2000
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 150	MAE 52 <i>bcsA101::MudJ</i> ; Km <sup>r</sup>	bdar/bdar	ZOGAJ ET AL., 2001
<i>S. Typhimurium</i>	MAE 316a	MAE 51 <i>rpoS101::</i> Km <sup>r</sup>	saw/saw	GERSTEL & RÖMLING 2001
<i>S. Typhimurium</i>	ADR 1a	MAE 52 <i>adrA101::MudJ</i> ; Km <sup>r</sup>	bdar/bdar	RÖMLING ET AL., 2000

<i>S. Typhimurium</i>	ADR 1b	MAE 51 <i>adrA101::MudJ</i> ; Km <sup>r</sup>	saw/saw	RÖMLING ET AL., 2000
<i>E. coli</i>	Y-Mel	Wildtyp	rdar/saw	Arne Olsen
<i>E. coli</i>	MC4100	K-12 F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta(\arg F-lac)_{U169}$ <i>rpsL150 relA1</i> <i>flbB5301 deoC1</i> <i>ptsF25 rbsR</i>	bas/saw	Laborsammlung
<i>E. coli</i>	Nissle 1917	Wildtyp	pdar/pas	Ute Römling
<i>E. coli</i>	<i>AbcsA</i>	Nissle 1917 $\Delta bcsA$	bas/saw	Xhavit Zogay
<i>E. coli</i>	<i>DagfD</i>	Nissle 1917 $\Delta agfD$	pdar/pdar	Xhavit Zogay
<i>Pseudomonas putida</i>	KT2440	Wildtyp	saw/saw	TIMMIS 2002

**Tab. 2:** Für Klonierungen und Phagentransduktion verwendete Hilfsstämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>S. Typhimurium</i>	SR-11	Wt; resistent gegen den Phagen P22	Roy Curtiss III.
<i>S. Typhimurium</i>	JF2757	SF261 x SF 530 UK1 <i>ompR43::MudJ</i> ; Km <sup>r</sup>	BANG ET AL., 2000
<i>S. Typhimurium</i>	CC1000	ATCC 14028-1s <i>rpoS::Tc<sup>r</sup></i>	CHEN ET AL., 1995
<i>S. Typhimurium</i>	SH9312	Alternativer Name: LB 5010	BULLAS & RYU 1983
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$	K-12 <i>EndA1 hsdR17 SupE44 thi-1 recA1 gyrA1</i> <i>relA1</i> $\Delta(\text{lacZYA-argF})_{U169}$ (m80lacZ $\Delta$ M15)	Laborsammlung

## II.4.2. Stammsammlungen:

Die EcoR-Sammlung (OCHMAN & SELANDER 1984) umfasst 72 verschiedene *E. coli*-Stämme, die über einen Zeitraum von etlichen Jahren aus unterschiedlichen Säugerspezies bzw. deren Ausscheidungen isoliert worden waren. Die Sammlung enthält 11 uropathogene Stämme menschlicher Herkunft sowie 61 Fäkalisolate. Bei der LT-Sammlung (LILLENGEN 1948) handelt es sich um eine reine *S. Typhimurium*-Sammlung. Sie umfasst 21 pathogene Stämme, von denen die meisten aus menschlichen Ausscheidungen einige wenige jedoch – analog zur EcoR-Sammlung – von diversen Tierspezies stammen. Alle Stämme lagen als Glycerolstocks vor.

## II.5. Mikrobiologische Arbeitsmethoden:

### II.5.1. Gießen von Agarplatten:

Der Agar wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und dann auf ca. 50° C abgekühlt. Zusätze wie Antibiotika wurden in entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten unter der Sterilarbeitsbank gegossen.

### II.5.2. Antibiotika (Sigma):

Alle Antibiotika wurden – sofern nicht anders angegeben – in den in Tab. 3 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Stammlösungen wurden alle bei –20° C aufbewahrt, die reinen pulverisierten Ausgangsstoffe bei 4° C.

**Tab. 3:** Arbeitskonzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicilin (Amp)	100 mg/ml H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Nalidixinsäure (Nal)	50 mg/ml H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	10 mg/ml MethOH	20 µg/ml
Kanamycin (Km)	50 mg/ml H <sub>2</sub> O	30 µg/ml
Tetracyclin (Tc)	10 mg/ml 70 % EthOH	20 µg/ml
Gentamycin (Gen)	15 mg/ml H <sub>2</sub> O	15 µg/ml
Streptomycin (Sm)	30 mg/ml H <sub>2</sub> O	30 µg/ml

### II.5.3. Animpfen von Flüssigmedien bzw. Ausstreichen und Ausplattieren von Bakterienstämmen auf Agarplatten:

Alle diesbezüglichen Arbeiten fanden ausnahmslos unter der Sterilarbeitsbank statt. Ausgestrichen bzw. angeimpft wurde mit Hilfe einer hitzesterilisierten Impföse. Agar-Strichkulturen wurden mittels autoklavierter Zahnstocher hergestellt. Wurde von Flüssigkultur ausplattiert, so wurde die entsprechende Menge an Suspension auf eine Agarplatte gegeben und mittels eines Glasspatels (Drigalski-Spatel) auf derselben solange verteilt, bis die Flüssigkeit restlos eingezogen war. Der Glasspatel wurde durch Eintauchen in 70 %igen Ethanol und anschließendes Abflammen desinfiziert.

### II.5.4. Inkubationsbedingungen:

#### II.5.4.1. Inkubation auf einer Agarplatte:

Wenn nicht anders angegeben wurden die jeweiligen Bakterienstämme auf einer Agarplatte ausgestrichen und entweder 24 h bei 37° C inkubiert oder 48 h bei 28° C. Ausnahmen bildeten die *S. Gallinarum*-Stämme sowie der *S. Pullorum*-Stamm (s. Kapitel III.1.1.), welche sich durch ein extrem langsames Wachstum auszeichneten, sowie Bakterienstämme, die unter Mangelbedingungen, z.B. auf M9- oder 2,2-Dipyridyl-Agarplatten angezogen wurden. Hier wurde Inkubation bei 37° C auf 48 h und Inkubation bei 28° C auf 72 h ausgedehnt.

#### II.5.4.2. Inkubation in Flüssigkultur:

##### II.5.4.2.1. Aerophile Bedingungen:

Zunächst wurde der entsprechende Bakterienstamm in 5 ml Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht im Rundlaufinkubator bei 37° C angezogen. Am nächsten Morgen erfolgte eine 1:100 Verdünnung der Über-Nacht-Kultur in dem gewünschten Medium. Um das Oberflächen-Volumen-Verhältnis für optimalen Sauerstoffaustausch möglichst hoch zu halten, entsprach die eingesetzte Flüssigkeitsmenge einem Zehntel des Fassungsvermögens des Erlenmeyerkolbens. Der Kolben wurde bei 37° C und 210 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, bis die gewünschte O.D.<sub>600 nm</sub> erreicht war (0,3 – 0,4 für die logarithmische Wachstumsphase; 2,5 – 5 für die stationäre Wachstumsphase).

Um Artefakte durch die Über-Nacht-Kultur zu vermeiden, wurde zwischen Über-Nacht- und Hauptkultur noch eine Vorkultur mit dem gleichen Medium wie die Hauptkultur geschaltet. In diesem Fall wurde die Über-Nacht-Kultur 1:10 verdünnt und die Vorkultur unter den Bedingungen der Hauptkultur bis zu einer O.D.<sub>600 nm</sub> von 0,7 gezogen. Dann wurde im Verhältnis 1:100 in den Hauptkulturansatz überimpft.

#### II.5.4.2.2. Mikroaerophile Bedingungen:

Verfahren wurde zunächst wie bei der aerophilen Kultur. Die Hauptkultur wurde jedoch in diesem Fall bei 28° C und 150 rpm inkubiert. Darüber hinaus befand sich die Hauptkultur in einem Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen der 1,7fachen Menge an eingesetzter Flüssigkeit, um die Durchlüftung einzuschränken, aber nicht gänzlich zu unterbinden.

#### II.5.5. Herstellung von Glycerolstocks:

Zur Konservierung von Bakterienklonen wurden Glycerolstocks angelegt. Glycerol lagert sich in die Zellmembranen ein und macht diese geschmeidig, so dass die Zellen beim Einfrieren infolge der Eisausdehnung nicht platzen und somit lebensfähig bleiben.

Die Klone wurden entweder auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert oder als Flüssigkultur im Rundlaufinkubator bei 37° C angezogen. Am folgenden Tag wurde die entsprechende Bakterienmasse mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in einem Gemisch aus 850 µl LB-Medium und 150 µl 87 %igem Glycerol resuspendiert. Beim Vorliegen einer Flüssigkultur wurden 850 µl dieser Kultur direkt mit 150 µl Glycerol vermischt. Diese in einem speziellen Einfrierbehältnis mit Schraubverschluss befindlichen Glycerolstocks wurden bei -70° C gelagert.

#### II.5.6. Oberflächenspannungstest:

Bei diesem Test wurde überprüft, ob biofilmbildende Bakterienstämme detergenzähnliche Stoffe absondern, die die Oberflächenspannung von Wasser herabsetzen. Die Stämme wurden zunächst unter biofilminduzierenden Bedingungen angezogen. Dann wurde etwas Zellmasse in 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert, so dass Suspensionen unterschiedlicher O.D.<sub>600nm</sub> entstanden. Von diesen Suspensionen wurden jeweils 10 µl auf eine Glasfläche aufgetropft. Als Referenz dienten Tropfen von 0,9 %iger NaCl- sowie 1 %iger SDS-Lösung. Die Tropfen wurden dann optisch mit Referenztropfen verglichen, wobei der SDS-Tropfen als Positiv- und der NaCl-Tropfen als Negativkontrolle dienten.

#### II.5.7. Replikaplattierung:

Mit dieser Technik nach Lederberg (SÜBMUTH ET AL., 1987) wird gleichzeitig eine große Anzahl Kolonien von einer Agarplatte auf eine andere übertragen. So lassen sich mit geringem Aufwand gezielte Aussagen über die Eigenschaften einzelner Klone auf unterschiedlichen Medien, z.B. den Phänotyp auf CR- und Mac-Lac-Agarplatten, treffen.

Der Lederberg-Stempel ist ein runder Metallblock, der einen etwas geringeren Durchmesser als eine Agarplatte hat. Zum Stempeln wurde dieser mit einem autoklavierten Samttuch überzogen, welches mit Hilfe eines ringförmigen Gummis an diesem befestigt wurde. Die mit Einzelkolonien bewachsene Ausgangsagarplatte wurde mit ihrer Oberfläche auf das Samttuch des Stempels gelegt. Anschließend wurde ein etwa 200 – 300 g schwerer Gegenstand für ungefähr 3 sec auf die Platte gestellt. Dadurch war gewährleistet, dass alle Kolonien in ihrem spezifischen Plattenmuster auf das Samttuch übertragen wurden. Nun wurde die gleiche Prozedur mit einer unbewachsenen Agarplatte wiederholt. So wurde das spezifische Plattenmuster der Ausgangsplatte auf eine neue Platte übertragen. So konnte später jede einzelne Kolonie zurückverfolgt werden.



## II.5.8. Ermittlung der Phänotypauftrittshäufigkeit bei verschiedenen *Escherichia coli*- und *Salmonella*-Stämmen:

### II.5.8.1. EcoR- und LT-Sammlung:

Von jedem Stamm wurde etwas Zellmasse von einer bewachsenen LB + 0,4 % Glukose-Agarplatte abgenommen und in 1 x PBS resuspendiert, so dass die Suspension eine O.D.<sub>600nm</sub> von 1 hatte. Anschließend wurden jeweils 100 µl von 10<sup>-5</sup>- und 10<sup>-6</sup>-Verdünnungen dieser Suspensionen in PBS auf einer CR-Agarplatte ausplattiert, wobei jeweils zwei Platten je Verdünnung und Stamm präpariert wurden. Ziel dieser Ausplattierungen war es, mindestens 100 auswertbare Einzelklone pro Platte zu erhalten. Es folgte eine Inkubation bei 37° C für 24 h. Am nächsten Tag wurde die relative Auftrittshäufigkeit eines jeden Phänotyps bestimmt. Entsprechend der prozentualen Phänotypauftrittshäufigkeit bei 37° C wurden 100 Einzelklone als Strichkulturen auf neue CR-Agarplatten überführt, welche diesmal für 48 h bei 28° C inkubiert wurden. Nach diesem Inkubationsschritt konnten schließlich endgültig die einzelnen Phänotypen bei 28° C/37° C sowie deren prozentuale Auftrittshäufigkeit dokumentiert werden.

### II.5.8.2. Isolierung und Phänotypbestimmung von Enterobacteriaceae aus humanen Stuhlproben:

Sollen gezielt diverse *E. coli*-Stämme und andere Enterobacteriaceae aus Stuhlproben isoliert werden, muss mit Hilfe von Mac-Lac-Platten eine Vorselektion vorgenommen werden. Ausscheidungen freiwilliger Versuchspersonen, die zuvor über die Art der Verwendung ihrer Stuhlproben aufgeklärt worden waren und ihr Einverständnis hierfür gegeben hatten, wurden auf Mac-Lac-Agarplatten ausgestrichen und bei 37° C für mindestens 20 h inkubiert. Ein repräsentativer Anteil der Zellmasse wurde in 1 x PBS resuspendiert und die Suspension auf eine O.D.<sub>600nm</sub> von 2 eingestellt. Anschließend wurden jeweils 100 µl von 10<sup>-5</sup>- und 10<sup>-6</sup>-Verdünnungen dieser Suspension in PBS auf einer neuen Mac-Lac-Agarplatte ausplattiert, wobei jeweils zwei Platten je Verdünnung und Stamm präpariert wurden. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37° C wurden die Platten, auf denen ca. 100 – 200 Einzelklone gewachsen waren, für eine Replikaplattierung verwendet. Die Klone wurden auf zwei CR-Agarplatten replikaplattiert, wobei eine Platte anschließend bei 37° C, die andere bei 28° C inkubiert wurden. So konnte der Phänotyp der Einzelklone bei 28° C/37° C direkt ermittelt werden.

### II.5.8.3. Uropathogene *Escherichia coli*-Stämme:

Die Abstrichproben stammten von Patienten aus dem Klinikum Celler Straße in Braunschweig. Dort wurde der Urin von Patienten mit Harnwegsinfektionen auf Cled-Agarplatten ausgestrichen und für 24 h bei 37° C inkubiert.

## II.5.9. Bestimmung der Artzugehörigkeit von Bakterienklonen anhand eines biochemischen Profils:

Bakterien lassen sich u.a. anhand eines biochemischen Profils klassifizieren (PARR 1938; SCHLEGEL 1992). So können einige Bakterienspezies beispielsweise bestimmte Zucker vergären, andere hingegen nicht. Dies lässt sich anhand spezifischer Farbreaktionen nachweisen. Eine Zuordnung zu einer bestimmten Bakteriengruppe erfolgte auf Grund folgender Testreaktionen:

Test auf das Vorhandensein folgender Enzyme:

β-Galaktosidase; Arginindihydrolase; Lysin-Decarboxylase; Ornithin-Decarboxylase; Urease; Tryptophan-Decarboxylase; Gelatinase; Cytochromoxidase, Katalase

Fermentationsvermögen folgender Zucker:

Glukose; Mannitol; Inositol; Sorbitol; Rhamnose; Saccharose; Melibiose; Amygdalin; Arabinose

Zusätzliche Tests:

Fähigkeit zur Citratverwertung; H<sub>2</sub>S-Bildung aus Thiosulfat; Indolbildung aus Tryptophan; Acetoinbildung aus Kreatin und Pyruvat; NO<sub>2</sub>- oder N<sub>2</sub>-Bildung aus Nitrat

Für die Reaktionen wurden fertige API 20E-Teststreifen (Kat-Nr. 20 100) sowie die dazugehörenden Reagenzien (Kat-Nr. 20 160) der Firma Biomerieux verwendet.

## II.5.10. Bestimmung des Serotyps:

Die Bestimmung des Serotyps der *E. coli*-Fäkalisolate und der uropathogenen *E. coli*-Stämme wurde vom Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger in Wernigerode vorgenommen.

## II.5.11. Prototrophie-Test:

Unter Prototrophie versteht man die Fähigkeit von Bakterien alle lebenswichtigen organischen Verbindungen wie Aminosäuren selbst zu synthetisieren (SCHLEGEL 1992). Hierzu benötigen sie lediglich das Coenzym Thiamin, eine organische Kohlenstoff- sowie anorganische Stickstoff-, Phosphat-, Sulfat- und Calciumquellen. Bei auxotrophen Bakterienstämmen hingegen ist der Syntheseweg mindestens einer lebenswichtigen Substanz defekt. Somit können diese Stämme nicht auf einem Minimalmedium gedeihen.

Die Bakterienstämme wurden auf M9 + CR-Agarplatten angezogen. Die Mutanten, die nicht auf diesen Platten wachsen konnten, waren auxotroph, alle anderen prototroph.

## II.5.12. Test auf *rpoS*-Funktionalität:

Die Katalase ist ein Enzym, welches für den Abbau von Wasserstoffperoxid in der Zelle benötigt wird. Die Expression des Gens, das für die Katalase kodiert, ist abhängig von dem Sigmafaktor  $\sigma^S$  (ATLUNG ET AL., 2002; MUKHOPADHYAY ET AL., 2000). Treten Mutationen im *rpoS*-Gen bzw. im komplexen Regulationsnetzwerk von *rpoS* auf, ist folglich keine bzw. deutlich verminderte Katalaseaktivität nachweisbar.

Die auf einer Agarplatte ausgestrichenen Klone wurden mit einem Tropfen Wasserstoffperoxid beträufelt. Uneingeschränkte Katalaseaktivität wurde durch eine starke Gasentwicklung, die zur Schaumbildung führte, nachgewiesen. Die Katalaseaktivität wurde wie folgt beurteilt: - = keine Aktivität, (+) = geringe Aktivität, + = Aktivität und ++ = starke Aktivität. Als Negativkontrolle diente der *S. Typhimurium*-Stamm MAE 42.

## II.5.13. Motilitätstest:

Zum Testen der Schwimmaktivität des entsprechenden Bakterienstammes wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein wenig Zellmasse von einer bewachsenen Agarplatte abgenommen und senkrecht in eine etwa 1 cm dicke LB-Schwimm-Agarplatte hineingestochen. Diese Schwimm-Agarplatte wurde mit dem Deckel nach oben in den 37° C-Brutschrank gestellt. Nach drei sowie nach sechs Stunden wurden die Durchmesser der einzelnen Ausbreitungskreise miteinander verglichen.

## II.6. Methoden der Proteinanalyse:

Wenn nicht anders angegeben, entstammen die Anleitungen dem Standardwerk *Current Protocols in Molecular Biology* (AUSUBEL ET AL., 1994).

### II.6.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Die Proteine wandern bei Anlegen von Spannung im Gel entsprechend ihres relativen Molekulargewichtes, da sie durch angelagerte SDS-Moleküle negativ geladen sind.

#### 2 x Auftragspuffer (90 ml):

0,5 M Tris pH 6,8	25	ml
87 %iges Glycerol	20	ml
SDS	4	g
Bromphenolblau	0,2	g
H <sub>2</sub> O	45	ml

Zur Herstellung von 1 ml einfachem Auftragspuffer wurden 475 µl H<sub>2</sub>O mit 475 µl 2 x Auftragspuffer vermischt. Anschließend wurden 50 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt, um die Ausbildung von Disulfidbrücken in den Proteinen zu verhindern. Anstelle von β-Mercaptoethanol fand bisweilen auch 10 mM Iodacetamid Anwendung.

#### II.6.1.1. Aufbereitung der Proben:

5 mg Feuchtgewicht an Zellmasse wurde in 200 µl 1 x Auftragspuffer resuspendiert und anschließend für 5 – 10 min bei 95° C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 6 – 12 µl der Suspension in die Gelslots des Sammelgeles pipettiert.

Für den AdrA-Nachweis wurde das β-Mercaptoethanol durch 8 M Harnstoff ersetzt und die entsprechende Probe nicht aufgeköcht. In auf diese Weise behandelten Proben ließ sich das AdrA als klare einzelne Bande auf dem Western Blot nachweisen.

#### II.6.1.2. Molekulargewichtsmarker:

Als Molekulargewichtsmarker dienten der Rainbow-Marker (Biorad; Kat-Nr. 161-0324) sowie der Multi-Mark Standard (Novex; Kat-Nr. LC 5725). Hiervon wurden jeweils 7 µl eingesetzt.

#### II.6.1.3. Elektrophoresebedingungen (Standard):

##### 10 x SDS-Laufpuffer:

Tris	30	g
Glycin	144	g
SDS	10	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

Die Zusammensetzung von SDS-PAGE-Gelen verschiedener Konzentration ist in Tab. 4 aufgeführt. Die dort angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf zwei Gele der entsprechenden Konzentration. Der pH wurde nicht eingestellt. Für den Lauf wurde 1 x SDS-Laufpuffer verwendet. Der Lauf wurde zunächst mit Anlegen von 100 V (10 V/cm) Spannung gestartet. Nachdem die Laufront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V



## II.6.2. Western Blotting (halbtrockenes Verfahren):

Bei diesem Verfahren werden vorher im Gel aufgetrennte Proteine mittels elektrischen Stromes auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen.

### II.6.2.1. Blotbedingungen:

#### 10 x Blotpuffer:

Tris	60	g
Glycin	29	g
SDS	3,7	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

#### 1 x Blotpuffer:

10 x Blotpuffer	100	ml
Methanol	200	ml
H <sub>2</sub> O	700	ml

Das fertige Gel wurde 15 min lang in 1 x Blotpuffer inkubiert. Parallel hierzu wurde die Blotapparatur aufgebaut. Zwei Whatman-Papiere, die ein wenig größer zugeschnitten waren als das Gel, wurden in Blotpuffer getränkt und glatt auf die Kathodenplatte aufgelegt. Anschließend wurden diese mit Blotpuffer beträufelt. Danach wurde das Gel ebenfalls glatt auf die Whatman-Papiere aufgelegt und mit Puffer beträufelt. Die exakt zugeschnittene PVDF-Membran, die zuvor mit mindestens 60 %igem Methanol aktiviert und anschließend 10 min lang in Blotpuffer inkubiert worden war, wurde nun auf das Gel aufgelegt. Es folgten wiederum zwei getränkte Whatman-Papiere und schließlich die Anodenplatte. Beschriftet wurde die Apparatur mit einer gefüllten 1-Liter-Schottflasche. Geblottet wurde bei 120 mA (2 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche) Stromstärke für eine Stunde. Bei mehr als einem Blot pro Kammer wurde die Blotting-Dauer auf eineinhalb Stunden erhöht. Nach dem Blotten wurden die Membranen entweder getrocknet, eingeschweißt und bei 4° C aufbewahrt, oder direkt in Abblocklösung (s.u.) gegeben.

### II.6.2.2. Immunoblotdetektion:

Mit dieser Methode lassen sich mittels spezifischer Antikörper gezielt bestimmte Proteine auf Western Blots nachweisen. Zunächst wird der Blot mit dem 1. Antikörper (1. AK), welcher spezifisch an das gesuchte Protein bindet, inkubiert. Nachdem der überschüssige 1. AK abgewaschen worden ist, erfolgt die Inkubation des Blots mit dem 2. Antikörper (2. AK). Dieser erkennt den 1. Antikörper und verstärkt so das Signal, da viele AK-Partikel des 2. AK sich an einen einzelnen Partikel des 1. AK heften. An den 2. AK ist das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, welches mit seinem spezifischen Substrat - ein Peroxid - dieses reduziert. Durch Zugabe des Substrates Luminol sowie einer Verstärkerlösung wird eine Lichtreaktion hervorgerufen. Dieses Licht wird dann auf einem Fotofilm festgehalten.

#### 10 x TBS, pH 7,6:

Tris	24,22	g
NaCl	80	g
H <sub>2</sub> O	800	ml

Der pH wurde anschließend mit HCl auf 7,6 eingestellt. Hinterher wurde mit Wasser ad 1 l aufgefüllt. Sterilisiert wurde durch Autoklavieren.

Tween-TBS (TBST):

1 x TBS	999	ml
Tween-20	1	ml

Zunächst wurde die PVDF-Membran – falls sie trocken war - mittels 60 %igem Methanol aktiviert. Anschließend wurde der Blot in 5 – 10 %ige Abblocklösung (5 – 10 % handelsübliches Magermilchpulver der Firma Glücksklee gelöst in TBST) zum Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen gegeben. Es folgte eine Inkubation, die – je nach Zeitplan - entweder über Nacht bei 4° C erfolgte oder für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Dann wurde der 1. AK in einer bestimmten Verdünnung (s.u.) in Abblocklösung (BL) dazugegeben. Wieder folgte entweder eine einstündige Inkubation bei RT auf dem Schüttler oder eine halbstündige Inkubation bei 37° C. Anschließend wurde der Blot zweimal für 10 min in reinem TBST gewaschen, bevor der 2. AK (A4c- $\alpha$ -mouse oder B4c- $\alpha$ -rabbit; Boehringer Mannheim) wieder in 5 %iger BL als 1:2000-Verdünnung hinzugegeben wurde. Danach folgten vier jeweils 10 min dauernde Waschschrte in TBST. Dann wurde der Blot auf eine Overheadfolie gelegt und die mit Proteinen beladene Seite mit Lumilight (Roche; Kat-Nr. 2015200) als Substrat für das Enzym beträufelt. Eine zweite Overheadfolie wurde nun daraufgelegt und der Blot - zwischen beiden Folien luftblasenfrei eingeklemmt - in einer Fotokassette fixiert. In der Dunkelkammer wurde nun ein hochempfindlicher Film (Kodak X-Omat<sup>TM</sup> AR; 13 x 18 cm; Kat-Nr. 618127) auf den Blot gelegt und die Kassette geschlossen. Die Dauer der Exposition war intensitätsabhängig und schwankte zwischen wenigen Sekunden und über einer Stunde. Anschließend wurde in der Dunkelkammer die Kassette geöffnet und der Film in die Entwicklermaschine gegeben. Nach etwa zwei Minuten war der Film entwickelt und konnte ausgewertet werden.

Die verschiedenen Antikörper wurden in den in Tab. 5 angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

**Tab. 5:** Zur Detektion verwendete Antikörper: BL = Abblocklösung

Protein	1. AK	Verdünnung	2. AK	Verdünnung
AgfA	$\alpha$ -AgfA	1:1000 in 5 %iger BL	$\alpha$ -Kaninchen-IgG	1:2000 in 5 %iger BL
AgfD	$\alpha$ -AgfD	1:2000 in 5 %iger BL	$\alpha$ -Kaninchen-IgG	1:2000 in 5 %iger BL
OmpA	$\alpha$ -OmpA	anfangs 1:90.000 in 10 %iger BL; später 1:5000 in 10 %iger BL	$\alpha$ -Kaninchen-IgG	1:2000 in 5 %iger BL
His-tag	$\alpha$ -Tetra-His	1:1000 in 5 %iger BL	$\alpha$ -Maus-IgG	1:2000 in 5 %iger BL

Der monoklonale  $\alpha$ -Tetra-His-Antikörper (Kat-Nr. 34670) wurde von der Firma Qiagen bezogen, die anderen aufgeführten Antikörper sind polyklonal und wurden entweder gegen das gesamte Protein (AgfA, OmpA) oder gegen Peptidsequenzen (AgfD) hergestellt.

## II.6.3. AgfA-Nachweis:

### II.6.3.1. Anreicherung von AgfA:

Die Anreicherung und MALDI-TOF Analyse von AgfA beruht darauf, dass AgfA in polymerisierter Form in den Fimbrien unlöslich ist und nur durch Behandlung mit >90% Ameisensäure depolymerisiert werden kann (COLLINSON ET AL., 1996 und 1999).

TE-Puffer, pH 8:

10 mM Tris  
1 mM EDTA

Der pH wurde mit HCl auf 8 eingestellt. Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren.

2 – 3 mg Zellmasse wurden in 1,5 ml TE-Puffer + 2 % SDS resuspendiert und anschließend für 45 min stark schüttelnd bei 95° C inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge A; Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Wasser resuspendiert. Wieder wurde 5 min lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und durch frisches Wasser ersetzt. Insgesamt wurden drei solcher Waschschrte durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Pellets bei –70° C eingefroren. Anschließend wurden die vollständig eingefrorenen Proben für mindestens zwei Stunden lyophilisiert. Am nächsten Tag wurden 20 µl 98 %iger Ameisensäure zu den getrockneten Pellets gegeben und die Proben für 10 min auf Eis gestellt. Nach erneutem Durchmischen der Proben wurden 4 µl abgenommen und in einem separaten Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Die restlichen 16 µl wurden im Vakuumtrockner eingedampft.

### II.6.3.2. AgfA-Nachweis via MALDI/TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time Of Flight - Mass Spectroscopy):

Bei dieser Methode wird das Protein mit einer festen Matrix kokristallisiert und durch Beschuss mit einem Laser ionisiert. Zur Massenbestimmung wird die Flugzeit gemessen, die durch ein elektrisches Feld beschleunigte Proteinionen benötigen, um eine Vakuumröhre zu durchfliegen. Aus der Flugzeit kann die Molekülmasse errechnet werden (BRAUN & NEUSSER 2002; NILSSON ET AL., 2002).

Von den 4 µl Probe wurden 1:10-, 1:100-, 1:1000- und 1:10.000-Verdünnungen mit einem Gesamtvolumen von 10 µl in reiner Ameisensäure hergestellt. Zusammen mit den 3 µl Ausgangslösung wurden die Verdünnungen im MALDI-Gerät gemessen. Hierzu wurden die Proben mit dem gleichen Volumen an Sinapinsäure - als UV-absorbierender Matrix - versetzt. 1 µl dieses Gemisches wurde auf eine Edelstahlplatte aufgetropft und bei RT getrocknet. Für die Messung wurde ein Bruker Reflex<sup>TM</sup> MALDI/TOF-Massenspektrometer mit einem N<sub>2</sub>-Laser (337 nm) benutzt. Die Pulsweite betrug 3 nsec bei einer Bestrahlungsstärke von 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> W/cm<sup>2</sup> auf der Oberfläche. Die positiven Ionenspektren wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV aufgenommen.

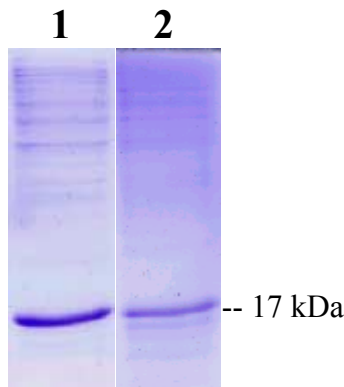
### II.6.3.3. AgfA-Nachweis im Coomassiegel und auf dem Western Blot:

Die eingedampften Pellets aus dem Anreicherungschrte wurden in 20 µl SDS-Auftragspuffer mit β-Mercaptoethanol resuspendiert. Ein Tris-Kristall wurde in jede Probe gegeben, um den pH-Wert wieder in den neutralen Bereich zu verschieben.

Anschließend wurde eine SDS-PAGE mit 15 %igen Gelen durchgeführt. Bei Proben von den Bakterienstämmen, bei denen eine Fimbrienbildung unter den entsprechenden Wachstumsbedingungen zu erwarten war, wurden 5 µl in die Slots pipettiert, bei den anderen 10 µl. Ein Gel wurde mit Coomassie bzw. Colloidal-Coomassie gefärbt, während das andere Gel geblottet wurde. Das AgfA auf dem Blot wurde anschließend mittels des α-AgfA-Antikörpers detektiert.

Konnten die Proben einmal nicht sofort nach Zugabe der Ameisensäure bearbeitet werden, so wurden sie solange, bis dieses möglich war, bei 4° C gelagert. Wie sich zeigte, hatte diese

Verzögerung kaum negative Auswirkungen auf die Qualität der Proben. In Abb. 3 ist dies anhand zweier Präparationen des Stammes MAE 52 in einem Coomassie-Gel demonstriert.



**Abb. 3:** Frische und ältere Proteinpräparation des *S. Typhimurium*-Stammes MAE 52 im Coomassie-Gel: **1:** Gel einer frischen Präparation; **2:** Gel einer sechs Wochen bei 4° C aufbewahrten Probe. Die verschiedenen Proteinbanden sind auch nach sechs Wochen Lagerung noch deutlich zu erkennen.

## II.6.4. Zellfraktionierung:

Mit diesem Verfahren (SCHNAITMAN 1981 und 1971) wird ein Zellaufschluss in die drei Kompartimente zytosolische Fraktion (C), innere Membran (IM) und äußere Membran (OM) getrennt. Da die Membranen beim Zellaufschluss zerstört werden, finden sich die im Periplasma befindlichen Strukturen zusätzlich zu den regulären cytoplasmatischen Einschlüssen in der zytosolischen Fraktion wieder (vgl. BECK & DOWNS 1999).

### II.6.4.1. Zellaufschluss und Probenaufbereitung:

#### Aufschlusspuffer (pH 7,5):

50 mM Tris  
100 mM NaCl

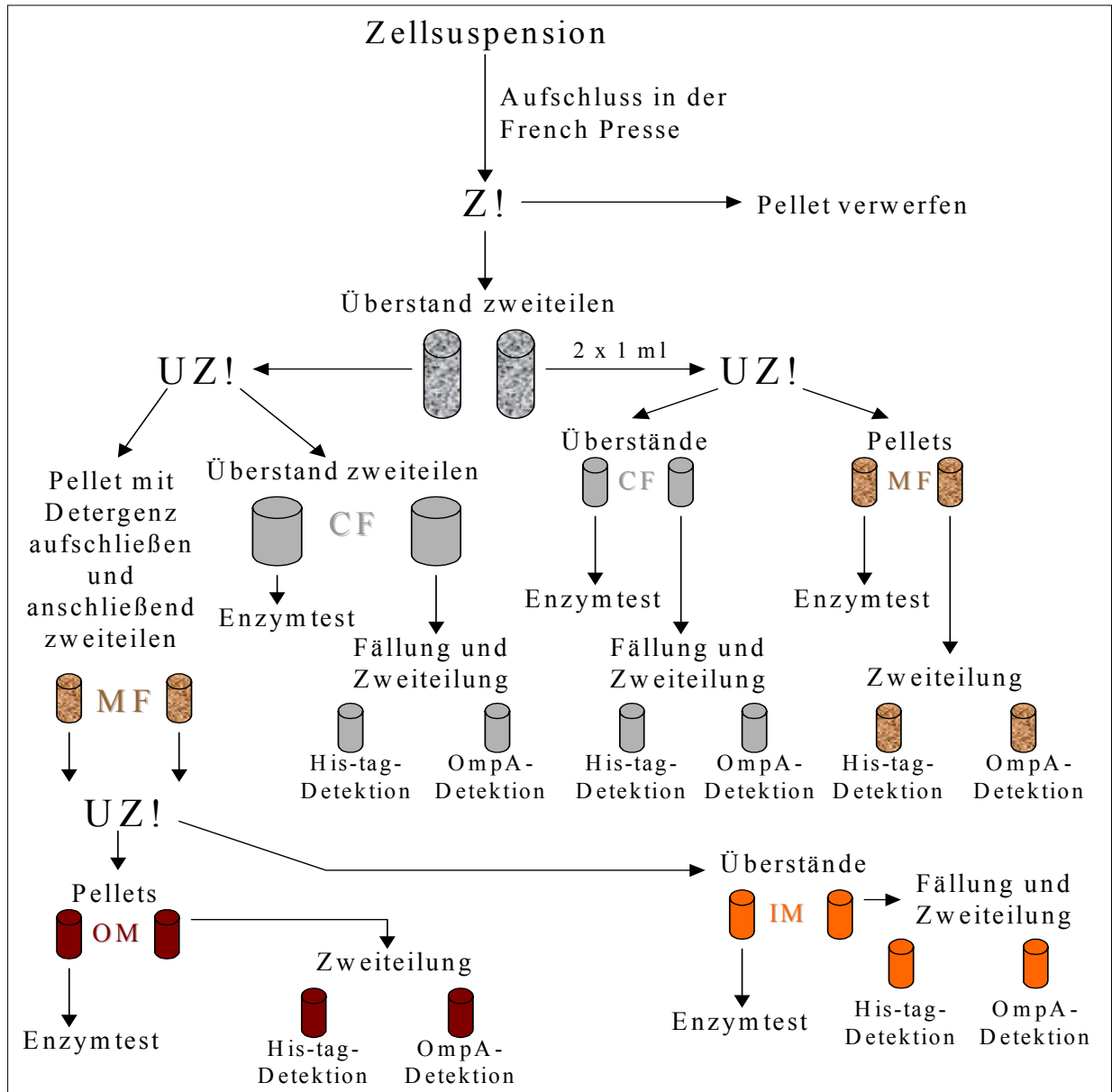
Der pH wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt. Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mM Pefablock (Boehringer) als Proteasehemmer.

Die gesamte Zellmasse einer gut bewachsenen Agarplatte wurde abgenommen und in 1 ml Aufschlusspuffer + 10 µg/ml RNase A + 10 µg/ml DNase I resuspendiert. Die O.D.<sub>600 nm</sub> wurde gemessen und die entsprechende Menge Zellsuspension mit o.g. Puffer auf 25 ml aufgefüllt, so dass sich rechnerisch eine O.D.<sub>600 nm</sub> von 3 ergab. Danach wurde die Suspension in der French-Presse bei 18.000 psi zweimal hintereinander aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation bei 5000 x g (6000 rpm; SC-5B; Sorvall; Rotor: SS-34) bei 4° C für 10 min zum Entfernen der nicht aufgeschlossenen Zellen. Anschließend wurde eine Hälfte der Suspension bei 107.000 x g AT<sub>max</sub> (28.000 rpm; LS-50 M/E; Beckmann; Rotor: SW 28) für 1 h 15 min in der Ultrazentrifuge bei 4° C zentrifugiert (vgl. LOFERER ET AL., 1997).

Um zu testen, ob durch eine Ultrazentrifugation unter den genannten Bedingungen eine saubere Trennung von zytosolischer und Gesamt-Membranfraktion erfolgte, wurden parallel zum oben genannten Schritt zweimal 1 ml Restsuspension bei 132.000 x g AT<sub>max</sub> (55.000 rpm; Optima TLX; Beckmann; Rotor: TLA 100.4), 4° C, für 1 h 15 min in der kleinen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Überstände entsprachen der zytosolischen Fraktion. Einer der beiden Überstände wurde für den Enzymtest (s.u.) bei -20° C eingefroren, beim anderen Überstand die Proteine mit dem dreifachen Volumen Aceton bei -20 Grad für 1 h gefällt. Nach der Fällung wurde die Probe bei 12.000 rpm (Avanti J-25; Beckmann; Rotor: JA-17) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand aus dieser Zentrifugation wurde verworfen. Die gefällten Proteine wurden nach Trocknen im Vakuumtrockner in 200 µl Auftragspuffer für SDS-PAGE ohne Zusätze resuspendiert und die Probe hiernach zweigeteilt. Eine Hälfte wurde mit



Harnstoff versehen, so dass die Endkonzentration 8 M betrug. Diese Hälfte war für die Proteindetektion von AdrA über His-tag gedacht. Das Lösen des Harnstoffs wurde durch Inkubation der Probe bei 37° C für 10 min erreicht. Zu der anderen Hälfte der Probe wurde Mercaptoethanol (Endkonzentration 5 %) zugegeben. Diese Hälfte war für die OmpA-Detektion vorgesehen.



**Abb. 4:** Fließschema einer Zellfraktionierung: CF = zytosolische Fraktion; IM = innere Membranfraktion; MF = Membranfraktion; OM = äußere Membranfraktion; UZ! = Ultrazentrifugation; Z! = Zentrifugation

Die beiden Pellets stellten die Gesamt-Membranfraktion dar. Eins der beiden Pellets wurde in 200 µl Aufschlusspuffer aufgenommen und für den Enzymtest (s.u.) bei -70° C eingefroren. Das andere Pellet wurde wiederum in 200 µl Auftragspuffer ohne Zusätze resuspendiert. Bei einer Hälfte wurde wieder für die Proteindetektion von AdrA über His-tag Harnstoff zugeben (Endkonz.: 8 M). Die andere Hälfte wurde wie gehabt mit Mercaptoethanol (Endkonz.: 5 %) für die OmpA-Detektion versehen.

Die eine Hälfte des Überstandes aus der ersten Ultrazentrifugation (zytosolische Fraktion) wurde bei -70° C aufbewahrt, die andere Hälfte erfuhr eine Proteinfällung mit dreifachem Volumen Aceton bei -20 Grad für 1 h. Anschließend wurde bei 14.000 x g und 4° C für 10 min

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zum Trocknen erneut zentrifugiert. Dieses Pellet wurde wiederum in 200 µl Auftragspuffer ohne Zusätze resuspendiert. Bei einer Hälfte wurde wieder für die Proteindetektion von AdrA über His-tag Harnstoff zugegeben (Endkonz.: 8 M). Die andere Hälfte wurde wie gehabt mit Mercaptoethanol (Endkonz.: 5 %) für die OmpA-Detektion versehen.

Das Pellet aus der ersten Ultrazentrifugation - die Gesamt-Membranfraktion - wurde in 450 bzw. 487,5 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Es wurden 50 µl einer 20 %igen Triton X-100-Stammlösung oder 50 µl bzw. 12,5 µl einer 20 %igen Sarkosyl-Stammlösung in Aufschlusspuffer hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe 30 min lang bei Raumtemperatur mittels eines Mikrorührfisches gerührt. Auf diese Weise wurde versucht, die Bestandteile der inneren Membran in Lösung zu bringen (vgl. HUNNICUT & MCBRIDE 2000; LOFERER ET AL., 1997; MICHIELS ET AL., 1990).

Die Probe wurde aufgeteilt. Es folgte eine weitere Ultrazentrifugation bei 39.211 x g AT rmax (30.000 rpm; Optima TLX; Beckmann; Rotor: TLA 100.4) für 1 h bei 4 bzw. 20° C. Der Überstand sollte erwartungsgemäß die Bestandteile der inneren Membran, das Pellet analog die Bestandteile der äußeren Membran enthalten. Einer der Überstände wurde für den Enzymtest bei -70° C eingefroren. Die Proteine des anderen Überstandes wurden mit dem dreifachen Volumen Aceton bei -20° C für 1 h gefällt. Anschließend wurde bei 12.000 rpm (Avanti J-25; Beckmann; Rotor: JA-17) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand aus dieser Zentrifugation wurde verworfen. Die gefällten Proteine wurden nach Trocknen im Vakuumtrockner in 200 µl Auftragspuffer für SDS-PAGE ohne Zusätze resuspendiert und die Probe hiernach zweigeteilt. Bei einer Hälfte wurde wieder für die Proteindetektion von AdrA über His-tag Harnstoff zugegeben (Endkonz.: 8 M). Die andere Hälfte wurde - wie üblich - mit Mercaptoethanol (Endkonz.: 5 %) für die OmpA-Detektion versehen.

Eins der beiden Pellets wurde in 200 µl Aufschlusspuffer aufgenommen und für den Enzymtest (s.u.) bei -70 Grad eingefroren. Das andere Pellet wurde wiederum in 200 µl Auftragspuffer ohne Zusätze resuspendiert. Bei einer Hälfte wurde wieder für die Proteindetektion von AdrA über His-tag Harnstoff zugegeben (Endkonz.: 8 M). Die andere Hälfte wurde wiederum mit Mercaptoethanol (Endkonz.: 5 %) für die OmpA-Detektion versehen. Abb. 4 verdeutlicht noch einmal die einzelnen Arbeitsschritte.

## II.6.4.2. NADH-Oxidase-Test:

Der NADH-Oxidase-Komplex – bestehend aus der NADH-Ubichinon-Reduktase, der Cytochrom-Reduktase und der Cytochrom-Oxidase - ist Bestandteil der Atmungskette und befindet sich in der inneren Zellmembran (SCHLEGEL 1992). Die Aktivität lässt sich anhand einer abnehmenden Substratkurve am Photometer bei einer Wellenlänge von 366 nm verfolgen. NADH + H<sup>+</sup> absorbiert Licht dieser Wellenlänge, NAD<sup>+</sup> jedoch nicht (RICHTER 1988). Die Cytochrom-Oxidase und somit der gesamte NADH-Oxidase-Komplex wird durch Cyanidionen spezifisch irreversibel gehemmt (LOFERER ET AL., 1997; SCHLEGEL 1992).

Mittels dieses NADH-Oxidase-Testes lässt sich die Qualität der durch die Zellfraktionierung tatsächlich eingetretenen Auftrennung der drei Zellkompartimente abschätzen. Spezifische Aktivität sollte im Idealfall nur in der inneren Membranfraktion nachweisbar sein.

### II.6.4.2.1. Standard-Reaktionsansatz:

In eine Quarzküvette wurden 330 µl Puffer (0,1 M Tris, pH 9,2), 610 µl Wasser und 25 µl einer 7,2 mM NADH-Lösung gegeben. Anschließend wurden 10 bis 50 µl Fraktionssuspension hinzugegeben und die Extinktion bei 366 nm über einen Zeitraum von 180 sec bei 37° C verfolgt (KÄRST 1985; vgl. SCHNEIDER 1975).

#### II.6.4.2.2. Variante:

Waren mit der Standardmethode keine zufriedenstellenden Ergebnisse zu erzielen, so wurde auf diese Variante des Standard-Reaktionsansatzes zurückgegriffen. Als Puffer diente hierbei eine Lösung mit folgenden Komponenten: 50 mM Tris, pH 7,5; 0,2 mM Dithiothreitol (DTT); 0,12 mM NADH in einem Endvolumen von 1 ml. Dieser Puffer wurde immer frisch angesetzt. 50 µl Fraktionssuspension wurden hinzugefügt und die Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 300 sec bei 37° C verfolgt.

#### II.6.4.2.3. Funktionstest:

Etwas Zellmasse wurde von einer gut bewachsenen Agarplatte abgenommen und in 1 x PBS + 1 mM Pefablock resuspendiert, so dass Zellsuspensionen mit einer O.D.<sub>600 nm</sub> von 3, 5 und 10 entstanden. Diese drei Proben wurden 4 x 20 sec lang auf Eis mit Ultraschall behandelt. Die Pausen zwischen den Behandlungen betrugen ebenfalls 20 sec. Mit diesen aufgeschlossenen Zellsuspensionen wurde der NADH-Oxidase-Test sowohl nach dem Standard-Reaktionsansatz, als auch nach der Variante durchgeführt.

#### II.6.4.2.4. Spezifitätstest:

War in einem Reaktionsansatz eine Abnahme des Substrates nachweisbar, so wurden zu einem neuen Reaktionsansatz derselben Fraktion 10 mM NaCN gegeben und wiederum die Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 300 sec bei 37° C verfolgt.

### II.6.4.3. Peroxidaseaktivitätsnachweis über Hämin:

Hämin ist das Eisen(III)-Oxidationsprodukt des Häms. Im Gegensatz zum Häm hat es eine rötlichbraune Farbe. Die Cytochrom c-Peroxidase (CCP) ist ein Enzym, welches für die Reduktion organischer Peroxide verantwortlich ist (VOET & VOET 1994). Die Reduktion verläuft über zwei Moleküle Cytochrom c. Cytochrom c lässt sich ebenfalls durch Oxidation anfärben, da es im aktiven Zentrum ein Häm c besitzt. Das Cytochrom c ist mit der inneren Bakterienmembran assoziiert. Somit gibt eine Anfärbung des Cytochroms c in einem SDS-Gel Aufschluss über die Reinheit einer Zellfraktion. Hat die Auftrennung des Zellaufschlusses in seine drei Hauptkompartimente gut funktioniert, so sollte nur die innere Membranfraktion angefärbt werden.

Jeweils 12 µl der Fraktionsproben versetzt mit 1 x SDS-Auftragspuffer + 5 % β-Mercaptoethanol wurden in die Slots des Sammelgeles eines 12 %igen SDS-PAGE-Geles pipettiert. Es folgte eine normale SDS-PAGE, bei der jedoch folgender Laufpuffer verwendet wurde: 0,05 M Tris; 0,06 M Borsäure; 0,001 M EDTA (Ethylendiamintetraacetat). Der Start des Geles erfolgte bei 100 V. Nach Erreichen des Trenngels durch den Bromphenolmarker wurde der Lauf bei 180 V fortgesetzt. Kurz vor Ende des Laufes wurden jeweils 12 µl dreier Häminstandards – 0,125 mM, 0,250 mM und 0,500 mM - in Auftragspuffer als Positivkontrollen in drei noch nicht belegte Slots pipettiert. Anschließend wurde der Lauf fortgesetzt, bis die Bromphenolfront das Ende des Gels erreicht hatte. Nach dem Lauf wurde das Gel bei RT für 30 min in 12,5 %iger Trichloressigsäure (TCA) gewaschen. Anschließend folgte ein Waschschriff von 30 min in Wasser. Kurz vor dem Färben wurde das Gel in 20 ml 0,5 M Natriumcitratpuffer (pH 4,4) + 400 µl 30 %igem Wasserstoffperoxid gegeben. Anschließend wurden 180 ml einer wässrigen Lösung zugegeben, die 200 mg o-Dianisidin als H<sup>+</sup>-Donator enthielt. Der Färbeprozess dauerte eine Stunde. Danach wurde das Gel für ein paar Minuten in Wasser gewaschen und ausgewertet (Methode nach FRANCIS & BECKER 1984).

#### II.6.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford:

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde der entsprechende Kitt von Biorad angewendet. Es wurde nach dem in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Standardprotokoll vorgegangen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Standardkurve wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt.

### **II.7. Zellulosedetektion:**

#### II.7.1. Isolierung von Zellulose mit der Updegraff-Methode:

##### Essig-Salpetersäure-Lösung:

80%ige Essigsäure	150	ml
konz. Salpetersäure	15	ml

Die Lösung wurde für jeden Isolierungsvorgang frisch angesetzt.

2 – 3 mg Zellmasse wurden abgewogen und in 1,5 ml Essig-Salpetersäure-Lösung für 30 min schüttelnd bei 95° C inkubiert, um alle anderen Zucker mit Ausnahme kristalliner Zellulose zu hydrolysieren. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge A; Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Wasser resuspendiert. Wieder folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in reinem Wasser resuspendiert. Diesmal folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge A; Heraeus) nach der wiederum der Überstand verworfen wurde. Dieser letzte Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Das Pellet wurde anschließend in ca. 80 µl reinem Wasser resuspendiert und in ein Glasgefäß (Wheaton Vial) übertragen. Die Glasgefäße waren zuvor durch mindestens 24-stündige Inkubation in reiner Chromschwefelsäure und anschließend gründlichen Spülen mit reinem destilliertem Wasser gereinigt worden. Die Glasgefäße wurden mit Parafilm verschlossen und die Pellets bei -70° C eingefroren. Anschließend wurden mit einem spitzen Gegenstand ein paar Löcher in den Parafilm gestoßen und die eingefrorenen Proben – je nach Zeitplan - meist über Nacht, mindestens aber für zwei Stunden, lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden mit 4 N Trifluoressigsäure (TFA) drei Tage lang bei 100° C inkubiert, um die Zellulose in ihre Glukoseeinheiten aufzuspalten, welche dann später mittels Gaschromatographie detektiert wurden (Methode nach UPDEGRAFF 1969).

#### II.7.2. Gaschromatographie (durchgeführt von Herrn M. Nimtz):

Anwendung fand die Methode von CHAPLIN 1982 bzw. CHAPLIN & KENNEDY 1986.

##### II.7.2.1. Benötigte Reagenzien:

- 1.) methanolische HCl (0,625 M): Herstellung durch Eintropfen von 4,4 ml Acetylchlorid in 100 ml getrocknetes Methanol unter Rühren und Eiskühlung
- 2.) Methylacetat; tertiäres Butanol; Methanol; Pyridin; Cyclohexan, jeweils zur Analyse
- 3.) Trimethylsilylierungsreagenz: Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) versetzt mit 1 % Trimethylchlorsilan

Zur Standardisierung wurden jeder Probe 100 ng meso-Inositol beigemischt.

### II.7.2.2. Derivatisierung der Monosaccharide:

Nach der Säurehydrolyse wurden die entstandenen Monosaccharidreste durch Erhitzen mit methanolischer HCl in die entsprechenden Methyl-Glykoside überführt. Die Proben wurden zunächst im Exsikkator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Danach wurden 200 µl methanolische HCl und 50 µl Methylacetat zugegeben. Nach gutem Durchmischen wurden die Proben für 16 h bei 70° C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl tertiäres Butanol hinzugefügt, um überschüssige HCl zu entfernen (Umsetzung zu tertiärem Butylchlorid und Wasser). Danach wurden die Lösungsmittel mittels Stickstoff abgeblasen.

### II.7.2.3. Trimethylsilylierung:

Dieser Schritt war notwendig, um die Glukose für die Gaschromatographie (GC) hinreichend flüchtig zu machen. Die Proben wurden mit 100 µl Pyridin und 50 µl BSTFA versetzt und für 1 h bei 70° C inkubiert. Das Derivatisierungsgemisch wurde im Verhältnis 1:2 mit Cyclohexan verdünnt und 1 µl dieser Lösung in den Injektor des Gaschromatographen gespritzt.

### II.7.2.4. Gaschromatographie (GC):

Verwendet wurde eine unpolare 30 m DB5-Kapillarsäule (Finnigan) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm. Als Trägergas diente Helium. Detektiert wurde mit einem Ionenfallenmassenspektrometer (GCQ) der Firma Thermo-Finnigan. Folgendes Temperaturprogramm wurde eingesetzt: 3 min isotherm bei 80° C, danach 10 grd/min bis 300° C. Das meso-Inositol diente hierbei als Standard.

## **II.8. Methoden der Nukleinsäureanalyse:**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die entsprechenden Anleitungen den Standardwerken *Current Protocols in Molecular Biology* (AUSUBEL ET AL., 1994) bzw. *Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria* (MALOY ET AL., 1996) entnommen.

### II.8.1. DNS-Techniken:

#### II.8.1.1. Agarosegelelektrophorese:

Diese Arbeitsmethode dient der Auftrennung von DNS-Fragmenten nach ihrer Größe durch ein Agarosegel im elektrischen Feld. Die negativ geladenen DNS-Moleküle wandern hierbei zur Anode der Gelkammer und werden durch den Siebeffekt des Geles voneinander getrennt. Für Fragmente, die kleiner als 400 Basenpaare (bp) sind, wird 2 %ige Agarose benötigt, ansonsten reicht ein geringerer Agaroseanteil.

#### 10 x TBE, pH 8,3:

45 mM Tris-Base  
45 mM Borsäure  
1 mM EDTA  
in Wasser; Sterilisation durch Autoklavieren

#### 50 x TAE, pH 7,5:

2 M Tris-Base  
1 M Natriumacetat  
0,05 M EDTA

in Wasser; Einstellung des pH auf 7,5 mit konzentrierter Essigsäure;  
Sterilisation durch Autoklavieren

5 x DNS-Auftragspuffer:

30 % (w/v) Ficoll	20	ml
500 mM EDTA, pH 8,0	4	ml
20 % (w/v) SDS	1	ml
50 x TAE, pH 7,5	0,8	ml
0,5 % (w/v) Xylenblau	2	ml
0,5 % (w/v) Bromphenolblau	2	ml
H <sub>2</sub> O	ad 40	ml

Die gewünschte Menge Agarose wurde abgewogen und in 1 x TBE- oder 1 x TAE-Puffer aufgekocht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Nach dem Abkühlen auf 60° C wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml in die Agarose gegeben, um später die DNS-Banden nach dem Lauf im Gel unter UV-Licht sichtbar zu machen. Anschließend wurde die Agarose in einen in einem Gießstand fixierten Elektrophoreseschlitten gegossen. Ein Kamm wurde in die noch flüssige Agarose gesteckt, um Taschen für die Proben in dem Gel zu erzeugen. Nach dem Erkalten der Agarose wurde der Kamm entfernt und das fertige Gel samt Schlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit dem Puffer aufgefüllt, der auch für die Herstellung des Geles Verwendung fand. Nun wurde die in Wasser + ¼ Volumen 5 x DNS-Auftragspuffer gelöste DNS in die Geltaschen pipettiert. Als Vergleichsgrößenmarker wurden 5 µl Smartladder (Eurogentec; Kat-Nr. MW-1700-10) mit aufgetragen, um später die Größe der aufgetrennten DNS-Fragmente ermitteln zu können. Der Smartladder verfügt über ein Größenspektrum von 200 bis 10.000 bp. Das Gel wurde anschließend bei einer Feldstärke von 3-7 V/cm gefahren. Der Gellauf wurde gestoppt, sobald die Bromphenollaufront mindestens zwei Drittel der Gelstrecke zurückgelegt hatte. Dann wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm photographisch dokumentiert.

### II.8.1.2. Konzentrationsbestimmung via Agarosegel:

Ein Vorteil des Smartladders ist, dass – bei Auftrag eines definierten Volumens (5 µl) - anhand der verschiedenen Leuchtintensitäten der einzelnen Banden im UV-Licht Rückschlüsse auf die DNS-Konzentration in einer Probe gezogen werden können. Hierzu wird eine Markerbande auf ca. der gleichen Laufrhöhe wie die Probenbande, die ungefähr dieselbe Leuchtintensität zeigt, herangezogen. Die entsprechende Menge DNS der Markerbande ist auch in der Probenbande vorhanden.

**Tab. 6:** Markerbanden des Smartladder (Eurogentec) mit entsprechenden DNS-Mengenangaben: bp = Basenpaare; ng = Nanogramm

Markerbande (bp)	DNS (ng)	Markerbande (bp)	DNS (ng)
10.000	100	2.000	20
8.000	80	1.500	15
6.000	60	1.000	100
5.000	50	800	80
4.000	40	600	60
3.000	30	400	40
2.500	25	200	20

### II.8.1.3. Aufreinigung eines DNS-Fragmentes aus einem TAE-Agarosegel mit einem Elutionskitt:

25 µl einer angereicherten DNS-Probe wurden mit 5 µl DNS-Auftragspuffer vermischt und für eine gewöhnliche Agarosegelelektrophorese auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen. Nach beendetem Lauf wurde die entsprechende DNS-Bande auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und das entsprechende Gelstück in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die DNS wurde dann via Gene-Clean-II-Kitt (Bio101; Nr. 1001-400) oder mit Hilfe des QIAquick-PCR-Purification-Kitts (Qiagen; Nr. 28106) aus der Agarose eluiert. Hierbei wurden die Arbeitsprotokolle, die den Kitts beilagen, genau befolgt. Nach beendeter Elution wurde die Ausbeute über ein TBE-Agarosegel bestimmt.

### II.8.1.4. Isolierung von DNS:

#### II.8.1.4.1. Extraktion von Gesamt-DNS:

Die Extraktion von Gesamt-DNS aus *Salmonella* oder *E. coli* erfolgte ausschließlich unter Verwendung des NucleoSpin Tissue-Kitts von Machery – Nagel (Kat-Nr. 740952.50). Hierzu wurde das beigefügte Protokoll zum Aufschluss von Bakterienzellen befolgt. Die Ausbeute lag immer zwischen 100 – 200 ng/µl.

#### II.8.1.4.2. Extraktion von Plasmid-DNS:

##### NaOH-Lösung:

0,2 M NaOH  
1 % SDS  
in Wasser; jedesmal frisch angesetzt

##### Kaliumacetatlösung:

5 M Kaliumacetat	60	ml
Essigsäure (konz.)	11,5	ml
H <sub>2</sub> O	28,5	ml

##### GET-Lösung:

50 mM Glukose  
25 mM Tris-Base, pH 8  
10 mM EDTA  
in Wasser; Sterilisation durch Autoklavieren

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur von Bakterien wurden bei 13.000 rpm (Biofuge A; Heraeus) für 1 min zentrifugiert und der Überstand hiernach verworfen. Bei der Isolierung eines Plasmides, welches nur mit geringer Kopienzahl in der Zelle vorlag, wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Das Pellet wurde in 100 µl einer Lysozymlösung (4 mg Lysozym/ml GET-Lösung) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dieser Schritt diente dem Aufbrechen der Zellwände. Anschließend wurden 200 µl NaOH-Lösung hinzupipettiert und die Proben gründlich gevortext. Es folgte eine etwa fünfminütige Inkubation bei RT, bis die Suspension klar geworden war. Nun waren die Zellen vollständig aufgeschlossen. Durch die Zugabe von 150 µl Kaliumacetatlösung wurde der pH-Wert soweit gesenkt, dass Proteine und Membranfragmente in Form eines kräftigen weißen Niederschlages ausfielen. Die Probe wurde etwa 2 min lang leicht geschüttelt, um eine gute Durchmischung der Komponenten zu erzielen. Kräftiges Schütteln bzw. vortexen war hier nicht förderlich, da hierdurch die

genomische DNS degradiert worden wäre. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (5 min; 13.000 rpm; Biofuge A; Heraeus) wurde der Überstand mit der isolierten Plasmid-DNS in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 200 µl eines 1:1 Phenol/Chloroform-Gemisches (Roth) wurden hinzugefügt, die Probe kräftig gevortext und erneut bei 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Entfernen restlicher Proteine und Membranfragmente aus der wässrigen Phase. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 1 ml 96 %iges Ethanol wurden hinzupipettiert, um die DNS zu fällen. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm. Anschließend wurde das Pellet mit 500 µl 70 %igen Ethanols gewaschen, um alle restlichen Salze zu entfernen. Wieder wurde für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet im Vakuumverdampfer getrocknet und hinterher in 30 µl Wasser, dem 1 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt worden war, aufgenommen. Die DNS-Konzentration der Probe wurde über ein Agarosegel bestimmt. Sie lag meist bei über 100 ng/µl.

Wurde besonders reine Plasmid-DNS benötigt, so erfolgte die Isolierung entweder über den GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kitt (Kat-Nr. 27-9601-02) von Amersham-Pharmacia Biotech Inc oder über den QIAprep Spin Miniprep Kitt von Qiagen (Kat-Nr. 12145). Die Ausbeute an Plasmid-DNS war hier jedoch meist geringer. Häufig lag sie lediglich bei 40 ng/µl.

## II.8.1.5. DNS-Primer:

### II.8.1.5.1. Design der Primer:

Die für diese Arbeit verwendeten Primer wurden anhand eines Matrizen-DNS-Stranges selbst entworfen und somit optimal auf die entsprechende Sequenz abgestimmt. Zu beachten war hierbei, dass die Länge der Primer bei ungefähr 22 Basen lag. Die Sequenz sollte keine internen Wiederholungen enthalten, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Primer sowie Fehlpaarungen an einer anderen Stelle der Matrizen-DNS weitgehend zu vermeiden (Annealing Temperatur ungefähr 60° C). Darüber hinaus sollte die Hybridisierungstemperatur (HT) beider Primer sich möglichst maximal um 2° C unterscheiden.

Die theoretische Hybridisierungstemperatur errechnet sich, indem für jedes Guanin und Cytosin der Sequenz 4° C und für jedes Adenin und Thymin 2° C angenommen wird. Dann werden die einzelnen Gradzahlen einfach zur Hybridisierungstemperatur des entsprechenden Primers aufaddiert, wobei nur zur Matrizen-DNS komplementäre Bereiche berücksichtigt werden. Andere eventuell angefügte Bereiche, wie z.B. Enzymschnittstellen, werden in die Berechnung nicht mit einbezogen.

Die so entworfenen Primer wurden anschließend von den Firmen GibcoBRL und Invitrogen auf einen Syntheseauftrag hin hergestellt. Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde experimentell über eine Test-PCR bestimmt.

### II.8.1.5.2. Verwendete Primer:

In Tab. 7 sind Bezeichnung, Sequenz und Verwendungszweck der Primer, welche für diese Arbeit Verwendung fanden, aufgelistet.

**Tab. 7:** Liste der verwendeten Primer mit Angaben zu ihrem Verwendungszweck

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Besonderheiten	Funktion
PRIMEX-1	CCCAAATTATAGAAAC AGAGCG	-	Primer Extension; <i>adrA</i>
PRIMEX-2	TTTTCATCATTATTAT TTTTG	-	Primer Extension; <i>adrA</i>
PRIMEX-3	GCGCTACCGCCTGTTCA ACCGC	-	Primer Extension; <i>adrA</i>



PRIMEX-4	GGTTGCGTCACTAACA CGGCGG	-	Primer Extension; <i>adrA</i>
PBAD30.YAIC.A	ACCTCTAGATAAGGAG GTTTCTAAATGTTCCCA AAAATA	<i>XbaI</i> -Schnittstelle; Shine-Dalgarno- Sequenz	PCR-Produkt des <i>adrA</i> für die Klonierung in pBAD30; Herstellung einer <i>adrA</i> -Sonde; Sequenzierung des <i>adrA</i>
PBAD30.YAIC.E	ACC AAGCTT CAATGAT GATGATGATGATGATG ATGTGCCGCCACTTCG GTGCGG	<i>HindIII</i> - Schnittstelle; Poly- His-tag	PCR-Produkt des <i>adrA</i> für die Klonierung in pBAD30
PASK75.YAIC.E	ACCCTGCA GTGCCGCC ACTTCGGTGCGG	<i>PstI</i> -Schnittstelle	PCR-Produkt für die Klonierung in pASK75; Herstellung einer <i>adrA</i> - Sonde; Sequenzierung des <i>adrA</i>
GGDEF-START	ACCGGATCCAGTTACC AAACGGCCATTAAATT AG	<i>BamHI</i> -Schnittstelle	PCR-Produkt des zytosolischen C-Terminus des AdrA für die Klonierung in pGEX 6p-1
HYDR.YAIC.E	ACCGCGGCCGCTCATG CCGCCACTTCGGTGC	<i>NotI</i> -Schnittstelle	PCR-Produkt des zytosolischen C-Terminus des AdrA für die Klonierung in pGEX 6p-1
ARA-C	ACCCTGCA GACGAAG CAGGGATTCTGCA	<i>PstI</i> -Schnittstelle	Klonierung: Fusion von pLAFR3 mit Elementen des pBAD30
BLA-30	ACCCTGCA GCCAGCGT TTCTGGGTGAGCA	<i>PstI</i> -Schnittstelle	Klonierung: Fusion von pLAFR3 mit Elementen des pBAD30
PSI F-2	CAA AAGCTT AAGTAAT AACAGTGTAACGTTAT GC	<i>HindIII</i> - Schnittstelle	PCR für Frontstück der <i>adrA</i> - Inframe-Deletion; Sequenzierung des Frontstückes
ADRA.A.RAUS-2	CAACTGCA GCGACCG CCTGTTCAACCGC	<i>PstI</i> -Schnittstelle	PCR für Frontstück der <i>adrA</i> - Inframe-Deletion; Sequenzierung des Frontstückes
ADRA.R.RAUS	CAACTGCA GCGTAACC GCACCGAAGTG	<i>PstI</i> -Schnittstelle	PCR für Endstück der <i>adrA</i> - Inframe-Deletion; Sequenzierung des Endstückes
PROC	CAAGGATCCGCCGCC TGCATGATCAG	<i>BamHI</i> -Schnittstelle	PCR für Endstück der <i>adrA</i> - Inframe-Deletion; Sequenzierung des Endstückes
M13uR (reverse; Stratagene)	GGAAACAGCTATGACC ATG	-	Sequenzierung beider <i>adrA</i> - Inframe-Deletion-Teilstücke
M13uF (-20; Stratagene)	GTAAACGACGGCCAG T	-	Sequenzierung beider <i>adrA</i> - Inframe-Deletion-Teilstücke
NP2 PROC	GAAGCGATGACGAAGT GTATGG	-	Sequenzierung des <i>adrA</i> und der <i>adrA</i> -Inframe-Deletionsmutante
NP2-PROC=GEGEN	CTGATCACGATACGGA ATTGCT	-	Sequenzierung der <i>adrA</i> -Inframe- Deletionsmutante
PSRUECK	GCATGACGACCTGTAA TCAGC	-	Sequenzierung des <i>adrA</i> und der <i>adrA</i> -Inframe-Deletionsmutante
PS-RUECK=GEGEN	GGAGTGACGAGATGGA GAAGA	-	Sequenzierung der <i>adrA</i> -Inframe- Deletionsmutante
HYDR.YAIC.A	ACCGTGCACAGTTACC AAACGGCCATTAAATT AG	<i>SallI</i> -Schnittstelle	Sequenzierung des <i>adrA</i>
YAIC.E	GTGCGGAACGCCGGCA GACA	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>
P1PROC	CAGCAAATCCTGATGA CTTTCG	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>
P2DDLA	ACTATTCTACCCGCAA TTTCG	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>
S1FR1	TAATGACGGGCAAAGA GAGC	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>
S2FR2 (PS2)	TAGCGTTATCTGTAATT GACG	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>

JR50	AGCGGATCAAGGGCTT TCGC	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>
YAIKENDE	GACGTAACCGCACCGA AGTG	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>
PS-1M	ACTCACCCGATAGCAC TACG	-	Sequenzierung des <i>adrA</i>
SP-1	GGACTCGGTGCTGTTGT AGC	-	Herstellung einer <i>agfD</i> -Sonde
SP-2	TTTCTCTTTCTGGATAA TGGG	-	Herstellung einer <i>agfD</i> -Sonde
AGFA60	CGGCCATTGTTGTGATA AATG	-	Amplifikation des <i>agfA</i>
AGFA66	ATGATGTTAACAATAC TGGGTGC	-	Amplifikation des <i>agfA</i>
PEXD1	TGACAGATGTTGCACT GCTG	-	Amplifikation des <i>agfBAC</i> - Operons + intergenischer Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
SP26	GGACATGTAACTCCTC AATG	-	Amplifikation des <i>agfBAC</i> - Operons + intergenischer Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
CsgB4	CGAGCCAGATCATAAT TTGTCG	-	Amplifikation des <i>agfDEFG</i> - Operons + intergenischer Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
SP32W	CGAGCAACATTCAGCG AATAC	-	Amplifikation des <i>agfDEFG</i> - Operons + intergenischer Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
CsgG	GGAGGATCCGTAGAAA AGTTACTTG	-	Amplifikation des <i>agfDEFG</i> - Operons ( <i>agfG</i> unvollständig) + intergenischer Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
CsgB1	GCTCTGGCAGCCAGAT CATAATTTGTCG	-	Amplifikation des <i>agfDEFG</i> - Operons ( <i>agfG</i> unvollständig) + intergenischer Region; Sequenzierung der intergenischen Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
CsgBD	ACGAAAGCTTGCACTG CTGTGGGTTG	-	Sequenzierung der inter-genischen Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
SP22	GAGATATCTTCCAGAG AACG	-	Sequenzierung der inter-genischen Region zwischen <i>agfD</i> und <i>agfB</i>
SP23	AAGTTACGTATTGGTG CCTC	-	Sequenzierung des <i>agfD</i>
SP24	TAACTCTGCTGCTACAA TCC	-	Sequenzierung des <i>agfD</i>
CsgD5	TTTAATGAAGTCCATA GTAGTC	-	Sequenzierung des <i>agfD</i>

### II.8.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Mit einer PCR (NEWTON & GRAHAM 1994) lassen sich gezielt bestimmte DNS-Fragmente amplifizieren. Dies wird durch ständiges Wiederholen eines Zyklus erreicht, der aus drei Phasen besteht: einer Denaturierungsphase, einer Primer-Hybridisierungsphase und einer Elongationsphase (ALPHEY 1998). Für eine PCR werden zwei gegenläufige DNS-Primer benötigt, von denen einer zum 5'-Ende, der andere zum 3'-Ende des Matrizen-DNS-Abschnitts komplementär ist. Der zwischen beiden Primern liegende DNS-Abschnitt wird amplifiziert. Bei jedem Zyklus erfolgt theoretisch eine Verdopplung der DNS-Moleküle. Bei der PCR wird die Hitzestabilität des Enzyms Taq-DNS-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* ausgenutzt. Durch die Entdeckung dieses Enzyms war eine Automatisierung des Verfahrens erst möglich.

Für einen 50 µl Ansatz wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

Matrizen-DNS:	(70 pg)	1	µl
dNTP	(8 mM)	5	µl
Primer 1	(5 µM)	5	µl
Primer 2	(5 µM)	5	µl
Taq-Puffer	(10 x)	4,5	µl
H <sub>2</sub> O		24,5	µl

Das Enzym, der Puffer sowie die dNTPs entstammten dem Takara-PCR-Kitt. Wurde die PCR in der Landgraf-PCR-Maschine durchgeführt, so wurde der Reaktionsansatz in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und mit ein paar Tropfen Mineralöl überschichtet, um Evaporation der Flüssigkeit zu vermeiden. Bei den PCR-Maschinen anderer Hersteller war dies nicht nötig, da hier auch der Deckel aufgeheizt wurde und so kein Temperaturgradient entstehen konnte.

Für den Start der PCR wurde der Reaktionsansatz zunächst für 5 min auf 98° C erhitzt, um die DNS vollständig zu denaturieren. Dann wurde der Ansatz auf die entsprechende optimale Hybridisierungs-Temperatur der Primer abgekühlt und bei dieser Temperatur inkubiert, bis 1 U Taq-Polymerase in 5 µl Reaktionspuffer zugegeben worden war. Dann wurde das folgende PCR-Programm gestartet.

#### Programm:

35 Zyklen:	HT° C	60	sec	Hybridisierungsphase
	72° C	80	sec	Elongationsphase
	94° C	60	sec	Denaturierungsphase
1 Zyklus:	HT° C	60	sec	Hybridisierungsphase
	72° C	300	sec	Elongationsphase

Danach wurde der Reaktionsansatz auf 4° C abgekühlt und bei dieser Temperatur gehalten. Der Erfolg der PCR wurde mittels eines Agarosegels überprüft.

### II.8.1.7. DNS-Sequenzierung:

Angewendet wurde ausschließlich die Sanger- oder Didesoxy-Kettenabbruchmethode (ALPHEY 1998; MALOY ET AL., 1996). Bei dieser Methode wird sich der Tatsache bedient, dass die DNS-Polymerase die 3'-OH-Gruppe des bereits synthetisierten neuen DNS-Stranges benötigt, um weitere Nukleotide anzuhängen. Fehlt diese, so kommt es zu einer vorzeitigen Termination. In der Praxis wird somit einen normalen PCR-Ansatz neben dNTPs zusätzlich mit ddNTPs versetzt, welchen die genannte OH-Gruppe fehlt. Diese werden in den Elongationsphasen nach dem Zufallsprinzip an die wachsenden DNS-Moleküle angehängt und führen zum vorzeitigen Abbruch der Kettenverlängerung. So entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge. Statistisch gesehen entstehen alle möglichen Fragmente mit der gleichen Häufigkeit, so dass sie – wenn sie auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel der richtigen Größe und Konzentration aufgetragen werden – eine Leiter ergeben, deren benachbarte Glieder sich lediglich durch eine Base in ihrer Länge unterscheiden. Jedes ddNTP ist an einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Dieser Farbstoff wird kurz bevor die einzelnen Fragmente das Gel verlassen von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Das Lichtsignal wird direkt in einen Computer eingelesen. Da die Fragmente in der ihrer Größe entsprechenden Reihenfolge, d. h. die kleinsten Fragmente zuerst, das Gel verlassen, lässt sich so die Sequenz des Matrizen-DNS-Stranges direkt ablesen. Bis zu 600 Basen eines DNS-Stranges können so gelesen werden. Als Matrizen-DNS kann sowohl lineare als auch zirkuläre DNS verwendet werden.

### II.8.1.7.1. Vorgehensweise:

#### Sequenzieransatz:

Premix		4	µl
Primer	(3,2 pmol)	1	µl
DNS		50	ng
H <sub>2</sub> O		ad 20	µl

Premix: Big Dye RR Terminator AmpliTaq Premix (PE Applied Biosystems; Kat-Nr.4303152)

#### Sequenzierprogramm:

25 Zyklen:	96° C	15	sec
	50° C	15	sec
	72° C	15	sec
1 Zyklus:	72° C	240	sec
danach halten bei	15° C		

Die DNS-Fragmente wurden nach erfolgter Sequenzierreaktion von überschüssigen Primern und nicht eingebauten ddNTPs gereinigt. Hierzu wurden 2 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl 95 %iges Ethanol hinzugefügt und die DNS-Fragmente mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) für 15 min gefällt. Es folgte ein Waschschriff mit 70 %igem Ethanol und abermalige Zentrifugation für 10 min. Das Pellet wurde getrocknet und in 3 µl Formamid/EDTA aufgenommen.

#### Formamid/EDTA:

Formamid wurde mit Amberlite MB-1 für 30 min gerührt und anschließend abfiltriert. Danach wurden 250 µl so behandeltes Formamid mit 50 µl Ladepuffer (PE Applied Biosystems: 50 mM EDTA und Dextranblau) versetzt.

### II.8.1.7.2. Sequenziergel:

Zum Sequenzieren werden lange dünne denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Sie enthalten neben dem Elektrophoresepuffer zusätzlich Harnstoff. Das Gel wird bei 55° C gefahren, um zu verhindern, dass die DNS Sekundärstrukturen ausbildet.

Es wurden 4 %ige Gele von 48 cm Länge verwendet.

#### Gelzusammensetzung:

Harnstoff	17,5	g
H <sub>2</sub> O	17,8	ml
10 x TBE	5	ml
30 % Acrylamid	5,6	ml
TEMED	2,5	µl
10 % APS	292	µl
Gesamtvolumen:	50	ml

Der Lauf im Sequenzer (PE Applied Biosystems) dauerte 10,5 h.

Anfangs wurden die Aufreinigung und der Sequenziergellauf von Frau P. Hagendorff durchgeführt, später jedoch wurde aus Zeitgründen die GATC Biotech AG hiermit beauftragt.

### II.8.1.8. DNS-Spaltung mit Restriktionsenzymen:

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNS an einer enzymespezifischen Stelle schneiden. Je nach Enzym wird eine spezifische Folge von meist sechs Basen erkannt, an der dann die DNS geschnitten wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden so gut wie ausschließlich zwei Enzyme pro Restriktionsansatz eingesetzt. Die entsprechenden Enzyme und Restriktionspuffer wurden von New England Biolabs (NEB) und Boehringer Mannheim bezogen. Für einen typischen Restriktionsverdauansatz wurden folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

DNS		1	µg
Enzym I	(10 U)	1	µl
Enzym II	(10 U)	1	µl
10 x Puffer		3	µl
H <sub>2</sub> O		ad 30	µl

Bei der Verwendung von BamH I als Enzym reichte der Einsatz von 0,5 µl Enzymstammlösung (5 U) aus. Nach gründlichem Vermischen der Komponenten erfolgte eine Inkubation bei 37° C für mindestens zwei Stunden bis maximal über Nacht.

### II.8.1.9. Ligation:

Die T4-DNS-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNS-Ketten. Nach Durchführung eines Restriktionsverdaues wurde dieses Enzym zur Verknüpfung verschiedener DNS-Moleküle verwendet.

#### 10 x Ligasepuffer:

660 mM Tris
50 mM MgCl <sub>2</sub>
10 mM Dithioerythrit
10 mM ATP, pH 7,5 (20° C)

In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

T4-Ligase	1	µl
10 x Puffer	1	µl
DNS	1-10	ng
H <sub>2</sub> O	ad 10	µl

Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 16° C.

### II.8.1.10. Dephosphorylierung:

Wurde ein Vektor, in den ein PCR-Fragment hineinkloniert werden sollte, mit nur einem Restriktionsenzym verdaut, so musste vor der Ligation eine Dephosphorylierung der 5'-Enden des geschnittenen Vektors erfolgen, um eine Religation des Vektors zu unterbinden. Hierfür wurde die Alkalische Phosphatase (Roche; Kat-Nr. 1 758 250) als Enzym verwendet. Für die Dephosphorylierung und die anschließende Ligation des Vektors mit dem PCR-Fragment wurden die dem Kitt beigefügten Puffer eingesetzt. Das beiliegende Arbeitsprotokoll diente als Anleitung.

## II.8.2. RNS-Techniken:

Wegen der Gefahr der Kontamination mit RNasen wurden alle Schritte in aus einem frisch geöffneten Vorratsbeutel entnommenen nicht autoklavierten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Zum Pipettieren wurden ausschließlich RNasefreie Sorenson-Filterspitzen (Roth) benutzt. Die verwendeten Lösungen sowie das Wasser wurden getrennt von allen anderen Lösungen autoklaviert. Agarosegelkammern und sonstiges Zubehör wurden zur Reinigung von RNasen vor ihrer Benutzung über Nacht in 20 %igem SDS inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde dann alles gründlich mehrfach mit sterilem Wasser gespült.

### II.8.2.1. Isolierung von Gesamt-RNS aus Zellen in der stationären Wachstumsphase:

#### RNS-Lösung I:

0,30 M Saccharose  
0,01 M Natriumacetat pH 4,5  
in autoklaviertem Wasser;  
Sterilisation durch Autoklavieren: Wegen des Karamellisierungsprozesses des Zuckers wurde bei mehrmaligem Autoklavieren die Sterilisationszeit auf 15 min reduziert.

#### RNS-Lösung II:

0,01 M Natriumacetat pH 4,5  
2 % SDS  
in autoklaviertem Wasser

#### 10 x DNasepuffer:

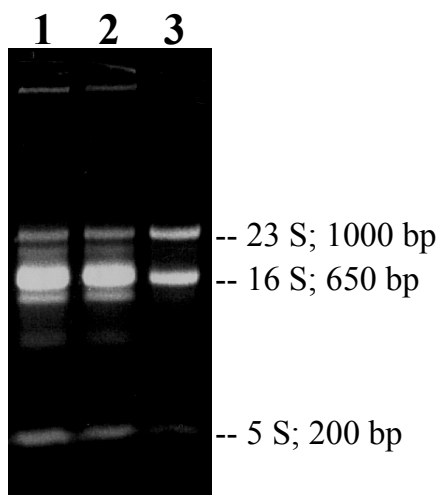
0,2 M Natriumacetat pH 4,5  
0,1 M Magnesiumchlorid  
0,1 M Natriumchlorid  
in autoklaviertem Wasser; Sterilisation durch Autoklavieren

#### II.8.2.1.1. RNS-Präparation von auf Agarplatte gewachsenen Zellen:

10 – 40 mg Zellmasse wurden in 300 µl eiskalter RNS-Lösung I resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl RNS-Lösung II und ein kräftiges Durchmischen durch Vortexen. Danach wurden die Proben bis zum nächsten Schritt auf Eis gestellt. Die Proben wurden im Folgenden für 2 – 5 min schüttelnd auf 65° C erhitzt. Anschließend wurden 600 µl 65° C heißes saures Phenol (Roth) hinzugefügt, alles gründlich durchmischt und für 3 – 5 min schüttelnd bei 65° C inkubiert. Es folgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm (Biofuge A; Heraeus). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Behandlung mit heißem saurem Phenol wiederholt. Nach der zweiten diesmal fünfminütigen Zentrifugation folgten zwei Phenolisierungen auf Eis mit eiskaltem saurem Phenol. Nach dem dritten Phenolisierungsschritt wurde der entstandene Flüssigkeitsverlust durch Zugabe von 200 µl sterilem Wasser ausgeglichen. Nach dem vierten Phenolisierungsschritt wurde die Probe nochmals für wenigstens 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um das restliche Phenol aus der Probe gänzlich zu entfernen. Anschließend wurden 40 µl 3 M Natriumacetat pH 4,5 und 900 µl 100 % iges Ethanol hinzugefügt und die Nukleinsäuren entweder für 20 min bei -70° C oder über Nacht bei -20° C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4° C für 20 min bei 14.000 rpm (Centrifuge 5402; Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Vakuumtrockner getrocknet.

Die Probe wurde in 200 µl einfachem DNasepuffer mit 1 mM DTT, 1 U/µl rekombinantem RNasin (Promega) als RNaseinhibitor und 0,05 U/µl RQ1 RNasefreier DNase I (Promega) aufgenommen und für eine Stunde bei 37° C verdaut. Danach wurden 200 µl gepuffertes 1:1 Phenol/Chloroform (Roth) zugegeben, die Probe gründlich gevortext und für 3 min bei 13.000 rpm (Biofuge A; Heraeus) zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurden 25 µl steriles 3 M Natriumacetat pH 4,5 sowie 500 µl 100 %iges Ethanol hinzugefügt und die RNS entweder für 20 min bei -70° C oder über Nacht bei -20° C gefällt. Nach der Fällung erfolgte eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4° C (Centrifuge 5402; Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Vakuumtrockner getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl einer wässrigen 40 mM DTT und 1 u/µl RNasin enthaltenden Lösung aufgenommen. Danach wurden maximal vier Proben desselben Stammes vereinigt und die Gesamtprobe über den E.Z.N.A. Bacterial RNA Kitt (PeqLab) aufgereinigt. Hierfür wurde das entsprechende dem Kitt beiliegende Protokoll befolgt. Die gereinigte RNS wurde mit 2 x 50 µl diethylpyrocarbonatbehandelten Wassers, welches dem Kitt beigelegt war, von der Säule eluiert. Danach wurden 100 µl der folgenden Lösung hinzugefügt: 2 mM DTT, 2 u/µl rekombinantes RNasin (Promega) sowie 0,02 u/µl DNase I (Promega) in 1 x DNasepuffer (1:10 mit sterilem Wasser verdünnter 10 x DNasepuffer). Es folgte eine Inkubation von mindestens 30 min bei 37° C. Nach diesem DNaseverdau wurden 200 µl neutralem 1:1 Phenol/Chloroform (Roth) zugegeben, gründlich gevortext und für 3 min bei 13.000 rpm (Biofuge A; Heraeus) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 25 µl steriles 3 M Natriumacetat pH 4,5 sowie 500 µl 100 %iges Ethanol hinzugefügt und die RNS erneut entweder 20 min bei -70° C oder über Nacht bei -20° C gefällt. Danach folgte wiederum eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4° C (Centrifuge 5402; Eppendorf). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet im Vakuumtrockner getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 6 bis 16 µl – je nach gewünschter Endkonzentration - einer wässrigen 40 mM DTT und 1 u/µl RNasin enthaltenden Lösung aufgenommen. Nach dem Resuspendieren wurde die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugiert und die Probe in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.



**Abb. 5:** TBE-Kontrollgel mit drei aufbereiteten Gesamt-RNS-Proben: **1. und 2.:** RNS-Präparationen zweier *S. Typhimurium*-Stämme; **3.:** RNS-Präparation eines *E. coli*-Stammes.

Bei der *E. coli*-RNS-Präparation sind deutlich von oben nach unten die 23 S-, 16 S- und 5 S-rRNS (ribosomale RNS) zu erkennen. Die Laufhöhe im Gel ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die für 23 S-rRNS kodierende DNS von *S. Typhimurium* enthält sog. „Intervening Sequences (IVSs)“, die in späteren posttranskriptionellen Prozessierungsschritten herausgeschnitten werden (MATTATALL ET AL., 1996; MILLER ET AL., 2000; PABBARAJU ET AL., 2000; SKURNIK ET AL., 1991). Dies erklärt die zahlreichen zusätzlichen Banden der *S. Typhimurium*-Proben im Gegensatz zu der *E. coli*-RNS-Präparation.

Die Ausbeute und Reinheit der Probe wurde anhand einer 1:100-Verdünnung in reinem Wasser photometrisch bestimmt, indem der Quotient O.D.<sub>260 nm</sub> zu O.D.<sub>280 nm</sub> bestimmt wurden. Durch das Photometer wurde automatisch die Konzentration an Gesamt-RNS berechnet, wobei 1 O.D.<sub>260 nm</sub> = 40 µg/ml RNS entspricht. Die Konzentration betrug üblicherweise 2,0 bis 14,0 µg/µl Gesamt-RNS. Je nach Bedarf wurde die Probe durch Verdünnen mit einer wässrigen Lösung, die 40 mM DTT sowie 1 u/µl RNasin enthielt, auf 2 bzw. 6 µg/µl eingestellt. Die

Qualität der Probe wurde via ein 1,3 %iges TBE-Agarosegel kontrolliert. 0,5 bis 1,0 µl Probe, 9,0 µl Wasser und 2,0 µl DNS-Auftragspuffer wurden in einen Gelslot pipettiert. Das Gel wurde bei maximal 4,5 V/cm gefahren.

#### II.8.2.1.2. RNS-Präparation von Zellen aus Flüssigkultur:

Für die Isolierung von RNS aus in Flüssigkultur angezogenen Bakterienzellen wurden zunächst die gewöhnlichen Arbeitsschritte über eine Über-Nacht-Kultur in LB-ohne-Salz + 0,3 M NaCl + Antibiotikum und einer anschließenden Vorkultur in LB-ohne-Salz + Antibiotikum durchlaufen. Die anschließende Hauptkultur wurde 1:1000 in LB-ohne-Salz angeimpft. Bei einer O.D.<sub>600 nm</sub> von 0,3 - 0,4 wurden 15 ml dieser Kultur abgenommen und bei 5000 x g (6000 rpm; SC-5B; Sorvall; Rotor: SS-34) für 10 min abzentrifugiert. Die Inkubation des Erlenmeyerkolbens mit der Hauptkultur wurde derweil fortgesetzt. Aus dem Pellet der Zentrifugation – etwa 10 mg Zellmasse (für *S. Typhimurium* gilt: 1 ml einer Zellsuspension mit einer O.D.<sub>600 nm</sub> von 3 = ca. 5 mg Zellmasse) – wurde wie oben beschrieben die Gesamt-RNS extrahiert. Der Überstand wurde verworfen. Am nächsten Morgen wurde die Inkubation der Hauptkultur gestoppt. Waren in der Kultur große Zellflocken sowie ein Rand auf Höhe des Flüssigkeitsspiegels sichtbar, so wurde RNS isoliert. 2 ml der Kultur wurden abgenommen und die Zellen bei 8000 rpm (Biofuge A; Heraeus) für 5 min abzentrifugiert.

#### II.8.2.2. Auftrennung der RNS in einem denaturierenden Agarosegel:

Da einzelsträngige mRNA Sekundärstrukturen ausbildet, wird ein denaturierendes Agarosegel zur RNS-Auftrennung benutzt.

Für ein 1 % Gel wurden 2 g Agarose in 144 ml steriles Wasser gegeben und aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem die Agarose auf etwa 60° C abgekühlt war, wurden 20 ml 10 x MOPS, 36 ml 37 %iges Formaldehyd und Ethidiumbromid in üblicher Konzentration (0,5 µg/ml) dazugegeben und das Gel unter dem Abzug in die entsprechende Gelkammer gegossen. Das fertige Gel hatte eine Dicke von ca. 1 cm.

##### II.8.2.2.1. Aufbereitung der Proben:

###### Formaldehyd-Ladepuffer:

- 1 mM EDTA, pH 8,0
- 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
- 0,25 % (w/v) Xylencyanol
- 50 % (v/v) Glycerol

###### 10 x MOPS (3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure)-Laufpuffer:

- 0,4 M MOPS, pH 7,0
- 0,1 M Natriumacetat
- 0,01 M EDTA
- in Wasser; Sterilisation durch Autoklavieren

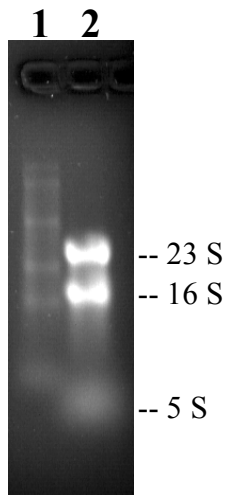
Zu 5 µl RNS-Probe (10 µg) wurden 2,5 µl 10 x MOPS-Laufpuffer, 4,5 µl 37 %iges Formaldehyd sowie 12,5 µl reines Formamid hinzupipettiert. Die Probe wurde für 5 min auf 65° C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden 2,5 µl Formaldehyd-Ladepuffer zugefügt, die Probe gevortext und die Flüssigkeit wieder herunterzentrifugiert. Anschließend wurde die Probe auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente der 0,24 – 9,5 kb RNS-Standard von GibcoBRL (Kat-Nr. 5620SA). 3 µl Standard, 2 µl Wasser sowie alle anderen oben aufgeführten Reagenzien wurden in den entsprechenden Mengen zusammengefügt und



diese Marker-Probe wie eine normale Probe behandelt. Zusätzlich zu dem Größenmarker wurde zur Kontrolle des Laufverhaltens der RNS eine aufbereitete Gesamt-RNS-Probe des *E. coli*-Stammes MC 4100 neben dem Marker auf das Gel aufgetragen.

#### II.8.2.2.2. Der Lauf:

Der Lauf erfolgte in 1 x MOPS-Laufpuffer bei 2,5 V/cm für 3 bis 4 Stunden. Wegen der geringen Pufferkapazität des MOPS-Laufpuffers wurde alle 30 min eine Umschichtung des Laufpuffers mit einer Glas-Pasteurpipette sowie ein kompletter Pufferaustausch nach 2 h vorgenommen.



**Abb. 6:** Kontrollabschnitt eines denaturierenden RNS-Agarosegels: **1:** Marker: Die Markerbanden entsprechen von oben nach unten folgenden Molekülgrößen: 9,5 kb; 7,5 kb; 4,4 kb; 2,4 kb; 1,4 kb und 0,24 kb. **2:** *E. coli*-RNS: 23 S-, 16 S- und 5 S-rRNS des *E. coli*-Stammes sind deutlich zu erkennen.

Nachdem die Bromphenolfront zwei Drittel der Gelstrecke zurückgelegt hatte, wurde der Lauf gestoppt. Das Gel wurde zweimal 20 min in reinem Wasser leicht schüttelnd inkubiert, um Reste des Laufpuffers auszuwaschen.

Zur Qualitätskontrolle wurden die ersten beiden Laufbahnen, die den Standard sowie die *E. coli*-Probe enthielten, dokumentiert. Das Gelstück wurde mit einem Skalpell sauber abgetrennt, über Nacht in Wasser gewaschen und am nächsten Tag fotografiert.

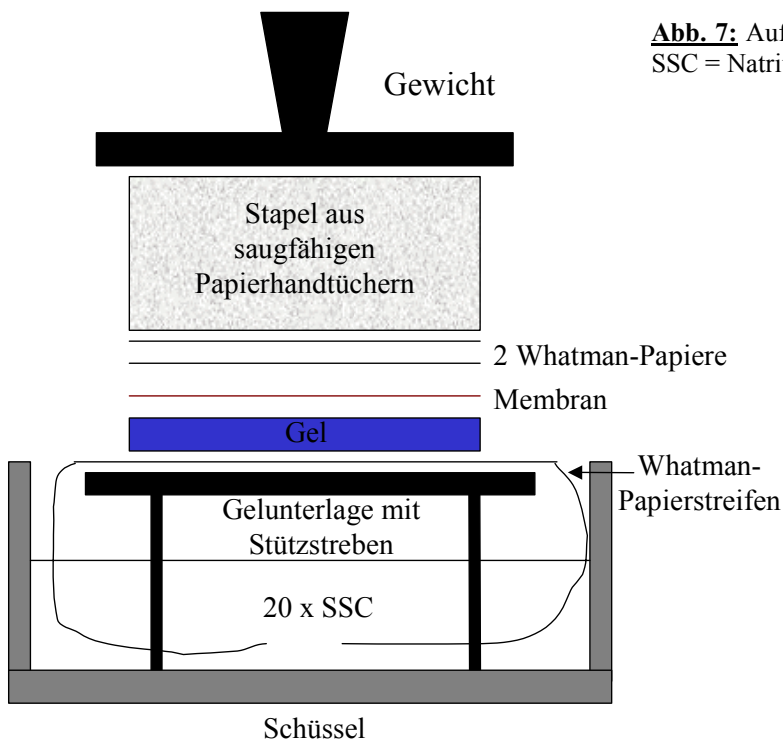
#### II.8.2.3. Northern Blot:

Unter einem Northern Blot versteht man den Transfer von RNS auf eine feste Trägermembran, z.B. Nylon. Auf einem Northern Blot kann mit Hilfe einer radioaktiv markierten und zur mRNA komplementären DNS-Sonde spezifisch die Boten-RNS (mRNA) eines bestimmten Gens nachgewiesen werden. So lässt sich die Größe der spezifischen mRNA feststellen. Darüber hinaus erlaubt die Größe des Transkriptes Rückschlüsse darauf, ob das entsprechende Gen allein transkribiert wird oder aber Bestandteil eines Operons ist. Ferner lassen sich Aussagen darüber treffen, unter welchen Wachstumsbedingungen und in welcher Wachstumsphase ein Gen transkribiert wird.

##### II.8.2.3.1. Verfahren:

20 x SSC, pH 7,0:

NaCl	175,3 g
Natriumcitrat	88,2 g
H <sub>2</sub> O	800 ml
Einstellung des pH auf 7,0, anschließend ad 1 l;	
Sterilisation durch Autoklavieren	



**Abb. 7:** Aufbau der Apparatur für den Northern Blot:  
SSC = Natriumcitratpuffer

Der Aufbau der Apparatur für den Northern Blot ist in Abb. 7 gezeigt. Geblottet wurde über Nacht für mindestens 12 Stunden. Durch Kapillarkräfte wurde der Puffer aus dem Pufferreservoir durch Gel und Membran transportiert. Hierbei wurde die RNS vom Gel auf die Membran übertragen. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und anschließend bei 80° C für zwei Stunden gebacken, um die RNS auf der Membran zu fixieren. Danach wurde der Blot zwischen zwei Whatman-Papiere gelegt, in Frischhaltefolie eingewickelt und bei -20° C gelagert.

#### II.8.2.3.2. Herstellung der DNS-Sonden:

Als Sonden für die Hybridisierung dienten PCR-Produkte des *adrA*- und des *agfD*-Gens. Für die *adrA*-Sonde wurden die Primer YaiC.pBAD30.A und YaiC.pASK75.E verwendet. Das resultierende PCR-Produkt war 1200 bp groß. Zur Herstellung der *agfD*-Sonde dienten die Primer Sp1 und Sp2. Die Größe des entsprechenden PCR-Produktes betrug 580 bp. Eine Kontrollhybridisierung wurde mit 16S-rDNS durchgeführt, die durch Restriktionsverdau mit *Hind*III aus dem Vektor pKK3535 erhalten worden war. Das herausgeschnittene DNS-Stück war 700 bp groß.

#### II.8.2.3.3. Sondenmarkierung mit Rad Prime Labelling System (Life Technologies):

Es wird ein Zufallsgemisch an DNS-Hexameren in entsprechender Konzentration verwendet, so dass die Hexamere ungefähr alle 100 bp binden. Das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I führt anschließend eine Elongation aus, bei der – neben gewöhnlichen Nukleotiden – auch radioaktiv markierte Nukleotide in die neu entstehenden DNS-Stränge eingebaut werden. Auf diese Weise erfolgt eine Markierung der DNS, die dann als Sonde eingesetzt werden kann.

Die in 20 µl Wasser gelöste Sonden-DNS (100 ng/ml Hybridisierungslösung) wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 95° C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Ebenfalls auf Eis wurden die nicht radioaktiven Nukleotide dATP, dTTP und dGTP (jeweils 500 µM in

Wasser) aufgetaut. Danach wurden jeweils 1 µl jeden Nukleotides, 20 µl 2,5 x Random Prime Puffer, 3 µl des radioaktiven Nukleotides  $\alpha$  P<sup>32</sup> dCTP (10 µCi/µl; Amersham) und 1 µl des Klenow-Fragmentes auf Eis in das Reaktionsgefäß mit der Sonden-DNS gegeben. Nach gutem Durchmischen und Zentrifugieren der Flüssigkeit folgte eine Inkubation für 10 min bei 37° C. Nach beendeter Inkubation wurden 5 µl Stopp-Puffer (im Kitt enthalten) hinzugefügt und die gesamte Lösung nach kräftigem Durchmischen mit Hilfe einer Sephadex G-50-Säule aufgereinigt. Hierzu wurde zunächst 1 ml Sephadex G-50 auf die Säule gegeben und bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Auffangbehälter der Säule mit dem Wasser wurde nun durch ein neues Reaktionsgefäß ersetzt und die Sondenlösung vollständig auf die Säule gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation (1 min bei 10.000 rpm) bei der die von überschüssigen Nukleotiden gereinigte Lösung aufgefangen wurde.

#### II.8.2.3.4. Hybridisierung:

##### 50 x Denhardts-Lösung:

Ficoll	5,0	g
Polyvinylpyrrolidon	5,0	g
Rinderserumalbumin	5,0	g
H <sub>2</sub> O	500	ml

Sterilisation durch Filtration

##### Hybridisierungslösung:

20 x SSC	2,5	ml
50 x Denhardts-Lösung	1,0	ml
37 %iges Formaldehyd	5,0	ml
10 %iges SDS	1,0	ml
Lachssperma-DNS	0,1	ml

Die Lachssperma-DNS (Fluka) wurde vor der Zugabe hitzedenaturiert. Sie diente dem Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran.

Ein bis zwei Blots wurden mit der RNS-tragenden Seite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml Hybridisierungslösung gegeben. Es folgte eine Prähybridisierung im Hybridisierungssofen bei 42° C. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung gegen frische Hybridisierungslösung, der zuvor 10 ng hitzedenaturierte markierte Sonden-DNS pro 1 ml Hybridisierungsflüssigkeit zugefügt worden waren, ausgetauscht. Nun folgte der eigentliche Hybridisierungsschritt in Form einer Inkubation über Nacht bei 42° C. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abdekantiert. Es folgten vier zehnminütige Waschschrte in 2 x SSC/0,2 % SDS bei 42° C sowie drei dreißigminütige Waschschrte in 0,2 x SSC/0,1 % SDS ebenfalls bei 42° C. Nachdem der Blot in Frischhaltefolie gewickelt worden war, wurden die radioaktiven Signale mit einer strahlungsempfindlichen Platte dokumentiert. Die Exposition erfolgte für drei bis fünf Stunden oder über Nacht. Anschließend wurde die Platte im Phosphoimager eingelesen und ausgewertet.

#### II.8.2.3.5. Abwaschen der Sonden:

Sollte ein und derselbe Blot mit mehreren Sonden behandelt werden, so musste die Sonde der ersten Hybridisierung zunächst abgewaschen werden. Der Blot wurde hierfür mindestens dreimal in 300 ml 0,01 bis 0,5 % SDS in Wasser für 15 min aufgekocht und der Blot jeweils in der Flüssigkeit auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Die auf dem Blot verbliebene Radioaktivität wurde nach jedem Waschschrte mit einem Geigerzähler gemessen. Wenn der Blot nicht mehr als 10 counts/sec zeigte, wurde eine neue Hybridisierung durchgeführt.

### II.8.2.4. Primer Extension:

Mit diesem Verfahren lässt sich der Transkriptionsstart eines Genes ermitteln. Hierfür werden ein bzw. mehrere DNS-Primer konstruiert, die sich mit 30 bis 100 Basen Abstand zu der Stelle anlagern, wo der Transkriptionsstartpunkt vermutet wird. Reverse Transkriptase benutzt RNS als Matrize, um DNS zu synthetisieren. Mit der entsprechenden mRNA als Matrize, wird ein DNS-Stück synthetisiert, das am Transkriptionsstartpunkt endet. Eine Sequenzierleiter mit demselben Primer dient zur Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes. Liegt dieses Produkt beispielsweise in der C-Leiter, so beginnt das primäre Transkript mit einem G. Anhand der Sequenzierleitern wird dann die entsprechende Stelle in der Sequenz gesucht.

#### II.8.2.4.1. Radioaktive Markierung der Primer durch die T4-Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim):

Bei dieser Markierungsmethode wird das Phosphat des 5' - Primerendes durch das radioaktive  $\gamma$  - Phosphat des eingesetzten Nukleotids  $\gamma$  P<sup>32</sup> dATP ausgetauscht.

Folgende Reagenzien wurden hierfür in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert: 1  $\mu$ l 10  $\mu$ M Primer; 2  $\mu$ l 10 x Kinasepuffer (Boehringer); 3  $\mu$ l  $\gamma$  P<sup>32</sup> dATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l; Amersham); 13,4  $\mu$ l Wasser sowie 1  $\mu$ l Kinase (10 u; Boehringer). Dieser Reaktionsansatz wurde zunächst für eine Stunde bei 37° C inkubiert, dann für 10 min bei 68° C, um das Enzym nach erfolgter Reaktion zu denaturieren. Hinterher wurde der Reaktionsansatz - wie in Kapitel II.8.2.3.3. beschrieben - über eine Sephadex G-50-Säule aufgereinigt.

#### II.8.2.4.2. Herstellung der A-, T-, G- und C-Sequenzleitern:

Die Herstellung der Sequenzleitern erfolgte durch die T7 DNS-Polymerase (Amersham) sowie dem dazugehörigen Sequenzierkitt von Amersham (Kat-Nr. 27-1682-01). Hierzu wurde das dem Kitt beiliegende Protokoll genau befolgt. Die radioaktive Markierung der entsprechenden DNS-Teilstücke wurde durch die Verwendung von  $\alpha$  P<sup>32</sup> dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l; Amersham) und der A-, T-, G- und C- Short-Mixe des Kitts bewerkstelligt. Als DNS-Matrize für die Sequenzierreaktionen diente ein Vektorkonstrukt, in das der zu untersuchende DNS-Abschnitt hineinkloniert worden war.

#### II.8.2.4.3. Primer Extension:

Als Matrize wurde Gesamt-RNS der *S. Typhimurium*-Stämme MAE 51 und MAE 52 verwendet, wobei MAE 51 als Negativkontrolle diente. Pro Reaktionsansatz wurden 30  $\mu$ g Gesamt-RNS eingesetzt.

Folgende Komponenten wurden in ein 50  $\mu$ l-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert: 2  $\mu$ l der markierten Primer; 2  $\mu$ l 5 x RT-Puffer (Boehringer) und 5  $\mu$ l Gesamt-RNS (6  $\mu$ g/ $\mu$ l). Der Reaktionsansatz wurde anschließend in die PCR-Maschine gestellt. Das PCR-Programm sah folgende Schritte vor: 1.) Inkubation bei 95° C für 90 sec; 2.) Inkubation bei 67° C für 10 min; 3.) Inkubation bei 50° C für 5 min; 4.) Pause bei 50° C: An dieser Stelle wurden 0,2  $\mu$ l AMV Reverse Transkriptase (Boehringer) und 1  $\mu$ l 50 mM dNTP (Boehringer) hinzugegeben; 5.) Inkubation bei 50° C für eine Stunde. Nach Beendigung des Programms erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ l Stopp-Puffer und eine anschließende Inkubation bei 95° C für 5 min. Danach wurde die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugiert und die Probe auf Eis gestellt. 2  $\mu$ l dieser Probe wurden jeweils in einen Gelslot pipettiert.

Der dNTP-Stock war ursprünglich 80 mM und musste entsprechend mit Wasser verdünnt werden. Als Stopp-Puffer diente der Stopp-Puffer des Sequenzierkitts, dem noch 10 mM NaOH zugefügt wurden.

#### II.8.2.4.4. Herstellung und Lauf des denaturierenden Harnstoff-Acrylamidgeles:

##### Gelzusammensetzung (12 %):

Harnstoff	25	g
5 x TBE	10	ml
30 %iges Acrylamid	20	ml

Reichte die Flüssigkeitsverdrängung durch den Harnstoff zum Erreichen der 50 ml-Markierung der Schottflasche nicht aus, so wurde die fehlende Flüssigkeitsmenge mit Wasser ergänzt. Der Harnstoff wurde durch Inkubation im Wasserbad bei 37° C gelöst. Dann wurden 80 µl 25 %iges APS und 60 µl TEMED hinzugefügt und die gesamte Lösung kräftig durchmischt. Anschließend konnte das Gel gegossen werden.

Die Gelform bestand aus zwei Glasplatten mit den Maßen 25 cm x 25 cm x 0,4 cm, von der eine eine Aussparung für den Kamm besaß. Diese Glasplatten wurden durch zwei seitliche Abstandhalter auf 0,5 mm Distanz gehalten und die Kanten ringsherum mit Vaseline abgedichtet. Das Ganze wurde dann in einem Gießstand fixiert und zum Gießen des Geles schräg aufrecht hingestellt. Die flüssige Gelmasse wurde luftblasenfrei mit Hilfe einer 10 ml Glaspipette in den Zwischenraum zwischen den beiden Glasplatten eingebracht und zum Schluss der Haifischzahnkamm in die Masse gesteckt. Das Auspolymerisieren dauerte ein bis zwei Stunden. Danach wurde das Gel samt der es umgebenden Glasplatten aus der Halterung genommen, der Kamm herausgezogen und die Vaseline am unteren Ende entfernt. Anschließend wurde das untere Pufferreservoir der Gelkammer mit 1 x TBE-Puffer aufgefüllt und das Gel senkrecht in der Gelkammer fixiert, so dass das untere Ende luftblasenfrei in den Puffer eintauchte. Dann wurde das obere Pufferreservoir mit 1 x TBE aufgefüllt und Luftblasen aus den Gelslots entfernt. Es folgte ein sog. Vorlauf ohne Proben für eine Stunde bei 45 V/cm Gel, um restliches APS aus dem Gel zu entfernen und das Gel auf die richtige Lauftemperatur zu bringen. Das Erwärmen war notwendig, damit sich keine DNS-Sekundärstrukturen ausbilden konnten. Anschließend wurde mit einer Pipette der inzwischen in die Slots diffundierte Harnstoff herausgespült. Nun wurden die Proben sowie die Sequenzierleitern – jeweils 2 µl pro Slot – möglichst zentral aufgetragen. Zur Verminderung des Smile-Effektes wurden zusätzlich rechts und links der äußeren Proben drei bis fünf Slots mit 2 µl Stopp-Puffer versehen. Dann wurde der Gellauf wieder bei 45 V/cm Gel gestartet. Nach etwa einer Stunde konnte das Gel gestoppt werden. Nach Entnahme des Gels aus der Apparatur wurde die erste Glasplatte vorsichtig entfernt und ein Whatman-Papier auf das Gel gelegt. Vorsichtig wurde nun das Gel von der zweiten Glasplatte abgehoben. Zum Schluss wurde noch eine Lage Frischhaltefolie auf die noch nicht abgedeckte Seite gespannt und das Gel anschließend für zwei bis drei Stunden bei 80° C auf dem Geltrockner getrocknet. Dann wurde es in eine Photokassette gebracht, eine strahlungsempfindliche Filmplatte daraufgelegt und die Photokassette geschlossen. Die Exposition erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Photoplatte in den Phosphorimager eingelesen und konnte hinterher ausgewertet werden.

## II.9. Klonierungen und Herstellung von Mutanten:

### II.9.1. Vektoren:

In Tab. 8 sind alle Vektoren, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden, sowie deren Bezugsquelle bzw. die Referenz, aus der Informationen über den jeweiligen Vektor zu beziehen sind, aufgeführt.

**Tab. 8:** Liste der verwendeten Vektoren: IPTG = Isopropylthiogalaktosid; GST = Glutathion-S-Transferase

Vektor	Charakterisierung	Referenz
pBAD30	L-arabinseregulierter Expressionsvektor; Amp <sup>r</sup>	GUZMAN ET AL., 1995
pUMR15	pBAD30::agfD; Amp <sup>r</sup>	RÖMLING ET AL., 2000
pASK75	Tc-regulierter Expressionsvektor; Amp <sup>r</sup>	SKERRA 1994
pGEX 6p-1	IPTG-regulierter Expressionsvektor zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen; Amp <sup>r</sup>	Pharmacia Biotech (Kat-Nr. 27-4597-01)
pLAFR3	RK2 oriT; Tc <sup>r</sup>	STASKAWICZ ET AL., 1987
pMAK700	enthält temperatursensitives Replikon des Vektors pSU101; Cm <sup>r</sup>	HAMILTON ET AL., 1989
pKK3535	enthält für die 16 S-rRNS kodierende DNS; Amp <sup>r</sup>	BROSIUS ET AL., 1981
pRK2013	enthält Konjugationsgene; Km <sup>r</sup>	Andre Lazdunski
pBluescript M13 + /KS	Klonierungsvektor; Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pUC8	Klonierungsvektor; Amp <sup>r</sup>	New England Biolabs (NEB)

### II.9.2. Transformation:

Unter einer Transformation versteht man das Einbringen von nackter DNS, zum Beispiel in Form eines Vektors, in eine Zelle. Es gibt im Wesentlichen zwei verschiedene Methoden, nämlich die Transformation durch Hitzeschock und die Elektroporation. Beide Methoden fanden für diese Arbeit Anwendung.

#### II.9.2.1. Transformation durch Hitzeschock:

Bei dieser Methode werden die Zellwände der Bakterienzellen durch Ca<sup>++</sup>-Ionen für DNS durchlässig gemacht. Durch kurzfristiges Erwärmen wird die Aufnahme von Vektor-DNS ermöglicht. Mit dieser Methode können bis zu 10<sup>7</sup> Transformanten je 1 µg Vektor-DNS erzielt werden.

##### II.9.2.1.1. Herstellung chemokompetenter Zellen (SEM-Zellen):

TB-Puffer (pH 6,7):

- 10 mM PIPES (Piperazin-N,N'-bis[2-Ethan-Sulfonsäure])
- 15 mM CaCl<sub>2</sub>
- 250 mM KCl

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6,7 eingestellt. Anschließend wurden 55 mM MnCl<sub>2</sub> hinzugefügt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4° C aufbewahrt.

250 ml einer Flüssigkultur, die in LB- oder SOB-Medium bei 18° C und 200 – 250 rpm unter aerophilen Bedingungen angezogen wurde, wurde bei einer O.D.<sub>600nm</sub> von 0,6 im

2 l-Erlenmeyerkolben für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Kultur in einen 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und bei 6000 rpm (6000 – 7000 x g) für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB resuspendiert. Es folgte eine erneute Inkubation im Eisbad für 10 min. Wieder wurden die Zellen bei 6000 rpm und 4° C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde diesmal in 20 ml TB resuspendiert. Unter sanftem Schütteln wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) langsam hinzugefügt, bis der Endgehalt der Flüssigkeit an DMSO bei 7 % lag. Es folgte eine erneute zehnmünütige Inkubation im Eisbad. Anschließend wurde die Suspension in 450 µl-Aliquots aufgeteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bei -70° C aufbewahrt und waren so etwa ein Jahr haltbar.

#### II.9.2.1.2. Transformation:

Chemokompetente Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und dann in ein Eisbad gestellt. Je 200 µl wurden auf Eis in ein 10 ml-Polyethylenröhrchen (Sarstedt) überführt. Dann wurden 5 µl (maximal 10 ng) Plasmidlösung hinzugefügt und der gesamte Transformationsansatz für 30 min im Eisbad inkubiert. Es folgte eine Kurzinkubation im Wasserbad bei 42° C für 30 sec. Anschließend wurde der Ansatz wieder ins Eisbad gestellt. Danach wurden 0,8 ml SOC-Medium hinzupipettiert. Der Ansatz wurde in den Rundlaufinkubator verbracht und bei 37° C für 1 h inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm (Megafuge 3.0R; Heraeus) und 4° C für 7 min. 0,8 – 0,9 ml des Überstandes wurden abpipettiert, das Pellet im restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Die Selektion erfolgte über entsprechende Antibiotikaresistenzen.

#### II.9.2.2. Elektroporation:

Bei der Elektroporation werden durch kurzfristiges Anlegen einer hohen elektrischen Spannung für kurze Zeit die Zellwände porös gemacht, wodurch die Vektor-DNS in die Zellen gelangen kann.

##### II.9.2.2.1. Herstellung elektrokompenter Zellen:

400 ml einer unter aeroben Bedingungen angezogenen Flüssigkultur mit einer O.D.<sub>600nm</sub> von 0,5 – 0,6 wurden im 2 l-Erlenmeyerkolben für 15 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Suspension in einen kalten Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 6000 rpm (SC-5B; Sorvall; Rotor: SS-34) und 2° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 ml eiskaltem 15 %igem Glycerol in Wasser resuspendiert. Wieder wurde die Flüssigkeit für 10 min zentrifugiert und der Überstand hinterher verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde ein Waschschrift mit nur 32 ml 15 %igem Glycerol durchgeführt, auf den ein weiterer mit 5 ml Glycerol folgte. Schließlich wurde das Endpellet in 0,5 µl 15 %igem Glycerol resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Suspension wurde in 50 µl-Aliquots aufgeteilt, welche dann in einem Trockeneis-Ethanol-Bad schockgefroren wurden. Die so aufkonzentrierte Zellsuspension wurde bei -70° C aufbewahrt.

##### II.9.2.2.2. Elektroporation:

Der Elektroporator wurde zunächst auf folgende Parameter eingestellt: Spannung 1,3 kV; Kapazität 25 µF und Innenwiderstand 400 Ω. 50 µl Suspension elektrokompenter Zellen wurden in eine 0,1 ml-Elektroporationsküvette (Biorad) gegeben. 1 µl Plasmidlösung (maximal 10 ng) wurden hinzugefügt und die Küvette so in den Elektroporationsstand gesteckt, dass die Elektroden der Küvette Kontakt mit denen des Elektroporationsstandes hatten. Nun wurde ein Stromstoß von etwa 10 msec gegeben und die Küvette hinterher wieder auf Eis gestellt. 1 ml SOC-Medium wurde hinzugefügt und die gesamte Suspension in ein 10 ml-

Polyethylenröhrchen (Sarstedt) überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37° C im Rundlaufinkubator für 1 h. Nach einer Zentrifugation bei 3500 rpm (Megafuge 3.0R; Heraeus) für 5 min wurden 0,9 ml des Überstandes abpipettiert. Das Pellet wurde im restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Die Selektion erfolgte wieder über Antibiotikaresistenzkassetten.

### II.9.2.3. Triparental Mating:

Mit dieser Methode wird die Fähigkeit des Austausches genetischen Materials zwischen Bakterien über Konjugation genutzt. Gebraucht wird hierfür ein Donorstamm, der ein zu übertragendes Plasmid mit entsprechenden Mobilisierungssequenzen enthält, ein Mediatorstamm, der ein Plasmid enthält, auf dem die zur Konjugation nötigen Gene lokalisiert sind und der eigentliche Akzeptorstamm. Wichtig hierbei ist, dass Donor- und Mediatorstamm eng miteinander verwandten Spezies angehören. Als Donorstamm diente in unserem Fall der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  mit dem entsprechenden Plasmid. Als Mediatorstamm wurde ein *E. coli*-Stamm, der das Plasmid pRK2013 mit den Konjugationsgenen trägt, verwendet. Der Akzeptorstamm muss eine zur Selektion geeignete Eigenschaft, z.B. eine Antibiotikaresistenz, besitzen, die dem Donor- und dem Mediatorstamm fehlt.

1 ml von jeder Über-Nacht-Kultur der drei Stämme wurden gut miteinander vermischt und dann für 5 min bei 6000 rpm (Megafuge 3.0R; Heraeus) zentrifugiert. Das Pellet aus dieser Zentrifugation wurde in 500  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. Vier Tropfen a 125  $\mu$ l wurden auf eine LB-Agarplatte pipettiert und trocknen gelassen. Es folgte eine Inkubation bei 37° C für 24 h. Am nächsten Tag wurde die Zellmasse eines jeden Tropfens in 200  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und anschließend auf einer LB-Agarplatte, die zwei Antibiotika enthielt, ausplattiert. Ein Antibiotikum entsprach dem der chromosomalen Resistenz des Akzeptorstammes das andere der Resistenzkassette, die das zu übertragende Plasmid trug. So wurde gewährleistet, dass nur die Akzeptorstämme, die das Plasmid trugen, wachsen konnten. Die Inkubation erfolgte bei 37° C für *Salmonellen* und *E. coli*, bei 28° C für andere Bakterienspezies.

### II.9.3. Klonierung von PCR-Fragmenten:

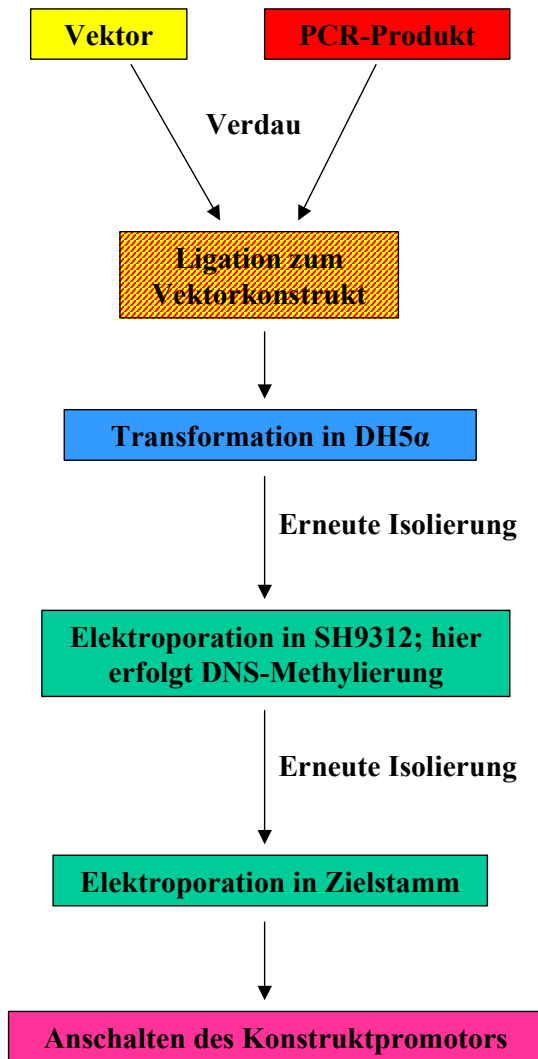
Unter einer Klonierung versteht man allgemein das Einbringen von Fremd-DNS in einen Organismus. Dies geschieht meist über einen Vektor, in den der entsprechende DNS-Abschnitt, ein PCR-Fragment, zuvor künstlich eingefügt wurde.

#### II.9.3.1. Verfahren:

Das PCR-Fragment wurde zunächst über ein TAE-Agarosegel aufgereinigt und mit den beiden Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen es trug, verdaut. Das Plasmid, in das das PCR-Fragment kloniert werden sollte, wurde aus dem entsprechenden Spenderstamm, meist ein *E. coli*, isoliert und ebenfalls mit denselben beiden Restriktionsenzymen wie das PCR-Fragment verdaut. So wurde sichergestellt, dass das PCR-Fragment später in der richtigen Orientierung in den Vektor integriert wurde. Es folgte eine Ligation und anschließend eine Hitzeschock-Transformation in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$ . Eine Elektroporation kam an dieser Stelle nicht in Frage, da die hohe Ionenkonzentration im Ligationsansatz einen zu starken Stromfluss hervorgerufen hätte. Anschließend wurde das Vektorkonstrukt aus DH5 $\alpha$  isoliert. Nach erfolgter Sequenzierung des nun in der Multi-Kloning-Site des Vektors befindlichen PCR-Fragmentes wurde das Vektorkonstrukt dann in den Zielstamm elektroporiert, sofern dieser ebenfalls ein *E. coli*-Stamm war. War der Zielstamm ein *Salmonella*-Stamm, so musste das aus dem DH5 $\alpha$  isolierte Vektorkonstrukt zunächst in den *S. Typhimurium*-Stamm SH9312 elektroporiert werden. *S. Typhimurium* verfügt über drei Restriktionssysteme zur Eliminierung



von Fremd-DNS. Im Gegensatz zur *E. coli*-DNS ist *S. Typhimurium*-DNS methyliert, wodurch die Zelle Fremd-DNS von zelleigener DNS unterscheiden kann. Der *S. Typhimurium*-Stamm SH9312 verfügt zwar über die entsprechenden Methylasen, nicht aber über die zum Abbau von Fremd-DNS benötigten Restriktionsendonukleasen (BULLAS & RYU 1983). Somit wird DNS aus *E. coli* von diesem *S. Typhimurium*-Stamm problemlos akzeptiert und anschließend in für *S. Typhimurium* typischer Weise methyliert.



**Abb. 8:** Schema einer Standardklonierung

Nach der Isolierung des Vektorkonstruktes aus diesem *Salmonella*-Stamm konnte somit schließlich die Elektroporation in den Zielstamm erfolgen. Von allen für die Klonierung modifizierten Stämmen wurden jeweils zwei Klone als Glycerolstock aufbewahrt. Um immer von demselben genetischen Hintergrund ausgehen zu können, wurde für nachfolgende Arbeitsschritte immer ein und derselbe Klon verwendet.

Vielfach erfolgte ein spezieller Zwischenklonierungsschritt, bei dem das PCR-Produkt erst in einen Klonierungsvektor kloniert wurde, bevor dieses mit dem Zielvektor geschah. Im Gegensatz zum einfachen Verdau des PCR-Produktes hatte dies den Vorteil, dass - nach erneuter Isolierung aus dem Stamm DH5α und anschließendem Restriktionsverdau - im Agarosegel festgestellt werden konnte, ob der Restriktionsverdau des Inserts vollständig erfolgt war.

### II.9.3.2. Rousconi-Test:

Wenn bei der Klonierung von DNS nach der Transformation die positiven Klone nicht eindeutig identifiziert werden können, wird der Rousconi-Schnelltest angewendet. Dies ist z.B. der Fall wenn auf der Agarplatte, auf der die Bakterien mit dem Vektorkonstrukt ausplattiert wurden, annähernd genauso viele Kolonien gezählt werden wie auf der Negativkontrollplatte. Die Methode entspricht im Wesentlichen der einer Plasmid-Isolierung.

#### Rousconi-Mix:

- 0,5 mg/ml Lysozym
- 25 mM EDTA
- 25 mM Tris-Base, pH 7,5
- 0,1 mg/ml RNase A
- in wässriger 10 %iger Glycerollösung
- + ein paar Kristalle Phenolblau; Lagerung bei –20° C

Etwa 20 Einzelkolonien wurden jeweils in 12 µl Rousconi-Mix resuspendiert und für 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 8 µl 1:1 Phenol/Chloroform hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und für 2 min bei 13.000 rpm (Biofuge A; Heraeus) zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde danach direkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese konnten anhand der Größe des Plasmides dann die Klone, die tatsächlich das Vektorkonstrukt enthielten, von denen, die lediglich den Ausgangsvektor trugen, unterschieden werden.

### II.9.4. Phagentransduktion:

Unter einer Transduktion versteht man die Übertragung von DNS von einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle mittels Bakteriophagen (KNIPPERS ET AL., 1990; SCHLEGEL 1992). Es wird allgemein zwischen genereller und spezifischer Transduktion unterschieden (SINGER & BERG 1992). Bei der generellen Transduktion kommt es zur Integration der Phagen-DNS an einer beliebigen Stelle im Bakterienchromosom, bei der speziellen Transduktion an einer bestimmten Stelle. Welcher Transduktionstypus im Einzelfall vorliegt, ist phagenabhängig. Beim *Salmonella*-Phagen P22 handelt es sich um einen Phagen, der generelle Transduktion durchführen kann. Mit dem Phagen P22 kann somit jede beliebige durch einen selektierbaren Marker gekennzeichnete Mutation von einem Bakterienstamm auf einen anderen übertragen werden (MALOY ET AL., 1996).

Verwendet wurde in jedem Fall der Phage P22 HT105/1 *int-201*. Dieser trägt im Gegensatz zum Wildtyp-P22-Phagen Mutationen, welche die Auftrittshäufigkeit eines Transduktionsereignisses deutlich erhöhen (MALOY ET AL., 1996; ZOGAY 1999).

Zum Pipettieren wurden beim Umgang mit Phagen immer Sorenson-Filterspitzen (Roth) benutzt, um eine Kontamination der Gilson-Pipetten mit Phagen zu vermeiden.

#### II.9.4.1. Herstellung des Phagenlysates:

##### II.9.4.1.1. Herstellung eines Phagenlysates (*S. Typhimurium*):

Der Spenderstamm wurde in 5 ml LB-Medium + dem entsprechenden Antibiotikum sechs Stunden lang bei 37° C im Rundlaufinkubator angezogen. Danach wurden 500 µl dieser Kultur mit 500 µl bis 2 ml eines P22 HT105/1 *int-201*-Phagenlysates in einem Reaktionsgefäß vereinigt und über Nacht bei 37° C im Rundlaufinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 7000 rpm (Biofuge 13; Heraeus) 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit drei Tropfen reinem

Chloroform versehen, um das erneute Wachstum von Bakterien zu verhindern. Dieses fertige Lysat wurde bei 4° C aufbewahrt.

#### II.9.4.1.2. Variante (*S. Enteritidis*):

Diese Methode fand bei einigen *Salmonella* Enteritidis-Stämmen Anwendung, bei denen die Ausbeute an Phagen bei der oben beschriebenen Methode gering war. Der Donorstamm wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium + dem entsprechenden Antibiotikum bei 37° C in Rundlaufinkubator angezogen. Am nächsten Tag wurden 500 µl dieser Bakterienkultur 1:10 mit LB-Medium verdünnt und erneut für zwei Stunden im Rundlaufinkubator bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Kultur mit 100 µl P22-Lysat vermischt und zu 5 ml 50° C warmem TOP-Agar gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde der Agar dann auf einer LB-Agar-Platte verteilt. Nach Erstarren des TOP-Agars wurde die LB-Platte mit dem Deckel nach oben in eine feuchte Kammer gestellt und für sechs Stunden bei 37° C inkubiert. Nach der Kontrolle, ob Plaques im Bakterienrasen sichtbar waren, wurde die Platte mit 5 ml LB-Medium + 10 mM MgSO<sub>4</sub> überschichtet und in der feuchten Kammer bei 4° C über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abpipettiert und 10 min bei 7000 rpm (Biofuge 13; Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 3 Tropfen Chloroform versehen und dieses fertige Lysat bei 4° C aufbewahrt.

#### II.9.4.2. Testen des Phagenlysates:

Der Empfängerstamm wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37° C im Rundlaufinkubator angezogen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit 3 ml 50° C warmem TOP-Agar vermischt und dieser auf einer LB-Platte verteilt. Nach Erstarren des TOP-Agars wurden jeweils 20 µl des zu testenden Lysates sowie 20 µl von 10<sup>-2</sup>-, 10<sup>-4</sup>-, 10<sup>-6</sup>-, 10<sup>-7</sup>- und 10<sup>-8</sup>-Verdünnungen desselben in 0,95 % NaCl-Lösung auf jeweils einen Bereich der Agarplatte aufgetropft. Nach Trocknen der Tropfen wurde die Testplatte mit dem Deckel nach unten in den 37° C-Brutschrank verbracht und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Plaques pro Verdünnung gezählt und die Plaque-Forming-Unit (PFU) für das entsprechende Lysat wie folgt ermittelt (MALOY ET AL., 1996):

$$\text{PFU/ml} = \text{Anzahl der Plaques} \times 1000 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l} \times \text{Verdünnung}$$

Ein gutes Phagenlysat sollte 10<sup>9</sup> bis 10<sup>11</sup> PFU/ml haben.

#### II.9.4.3. Transduktion:

Der Empfängerstamm wurde in 5 ml LB-Medium bei 37° C im Rundlaufinkubator für sechs Stunden angezogen. Anschließend wurden 200 µl Zellsuspension mit 2 µl bzw. 20 µl Phagenlysat versetzt und in einem Reaktionsgefäß für 15 min im Rundlaufinkubator bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium + 10 mM EGTA zugegeben und 20 min lang unter denselben Bedingungen weiterinkubiert. Durch die Zugabe des Chelators EGTA werden dem Medium Mg<sup>2+</sup>-Ionen entzogen, was die Anheftung weiterer Phagen an die Bakterienzellen verhindert. 200 µl dieser Suspension wurden im Folgenden auf einer LB-Agar-Platte + 10 mM EGTA + dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

#### II.9.4.4. Test auf lytische Phagen:

Waren lytische Phagen innerhalb einer Bakterienkolonie vorhanden, so wurden die Zellwände der Bakterienzellen porös. Dies konnte mit Hilfe von EBU-Agarplatten gezeigt werden. Bakterienkolonien, die auf einer EBU-Agarplatte angezogen worden waren, nahmen die

Farbstoffe derselben auf, sofern ihre Zellwände porös waren. Blieben sie weiß, so war dies ein Zeichen dafür, dass die entsprechenden Klone frei von lytischen Phagen waren.

#### II.9.4.5. Nachweis des Vorhandenseins lysogener Phagen im Bakteriengenom:

HT5 stellt eine lytische Mutante des Phagen P22 dar. Bakterienzellen, die einen lysogenen P22-Phagen in ihrem Genom besitzen, sind immun gegen den Angriff weiterer P22-Phagen (LEWIN 1998) und werden somit beim Kontakt mit HT5 nicht lysiert.

Ein Tropfen eines HT5-Lysates wurde am Rand einer LB-Agarplatte aufgetragen und durch Schrägstellen derselben quer über die Platte laufen gelassen. Senkrecht hierzu wurden die zu testenden Klone quer über die Platte ausgestrichen und somit durch die HT5-Spur gezogen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C. Klone, die keinen lysogenen P22-Phagen integriert in ihrem Chromosom besitzen, sollten bei Kontakt mit HT5 sofort lysiert werden und somit nicht wachsen. Die Klone mit einem integrierten P22-Phagen sollten immun gegen HT5 sein und ein normales Wachstum zeigen.

#### II.9.5. Gendeletion im Leserahmen:

Bisweilen ist es notwendig, ein funktionelles Gen auszuschalten, ohne eine Resistenzkassette einzufügen. Zu diesem Zweck werden Inframe-Deletionsmutanten geschaffen. Eine Inframe-Deletion wird hergestellt, indem ein Großteil des Mittelstückes eines Gens herausgeschnitten wird, ohne das Leseraster zu verschieben. Dieses verkürzte Gen wird dann normal transkribiert. Bei der Translation entsteht jedoch ein nicht funktionierendes Restprotein bzw. Peptid. Der Vorteil einer Inframe-Deletion gegenüber einer Genmodifikation durch eine Insertion ist der, dass stromabwärts liegende Gene in ihrer Expression nicht beeinflusst werden. Liegt das modifizierte Gen in einem Operon, so kann durch das gezielte Ausschalten dieses Gens auf seine Funktion geschlossen werden.

Hergestellt wurde eine Inframe-Deletionsmutante, indem zunächst zwei ca. 600 bp große DNS-Stücke via PCR amplifiziert wurden. Diese DNS-Stücke entsprachen dem Anfangs- bzw. Endbereich des zu modifizierenden Gens sowie der an diese angrenzenden außerhalb des Gens liegenden Bereiche. Die beiden Primerpaare wurden so gewählt, dass das später translatierte Restprotein lediglich 10 % - inklusive der durch die beiden Enzymschnittstellen der Primer bedingten Fremdaminosäuren - des ursprünglichen Proteins an Größe ausmachte. Jedes PCR-Fragment wurde zunächst für sich in den Vektor pBluescript KS+ kloniert und in dem *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  vermehrt (vorderes Teilstückkonstrukt: pWJB4; hinteres Teilstückkonstrukt: pWJB3). Anschließend wurden die entsprechenden Vektorkonstrukte wieder aus den Bakterienklonen isoliert und die PCR-Fragmente sequenziert. Nach eingehender Prüfung der Sequenzen auf Mutationen wurden die PCR-Fragmente aus dem Plasmid mittels Restriktionsverdau wieder excisiert und miteinander sowie mit dem Vektor pMAK700 ligiert (pWJB5).

Dieser Vektor (HAMILTON ET AL., 1989) ist temperatursensitiv und wird bei Inkubation des ihn tragenden Bakterienklones bei mehr als 30° C nicht mehr repliziert und abgebaut. Werden jedoch zum Bakterienchromosom homologe Bereiche in den Vektor hineinkloniert, kann dieser sich durch homologe Rekombination vorübergehend vollständig in das Bakterienchromosom integrieren und bleibt der Zelle so erhalten.

Das fertige pMAK700-Vektorkonstrukt mit den beiden PCR-Fragmenten wurde zunächst in den Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Nach erneuter Isolierung aus diesem erfolgte – wie gewöhnlich – die Elektroporation in den *Salmonella*-Stamm SH9312. Auch aus diesem Stamm wurde das Vektorkonstrukt wieder isoliert. Ein Kontrollverdau mit den beiden Enzymen, deren Schnittstellen außen an den beiden miteinander ligierten PCR-Fragmenten lagen, wurde

angesetzt. Verdaut wurde lediglich für eine Stunde bei 37° C. Das Resultat wurde anhand eines Agarosegels überprüft. Schließlich wurde das pMAK700-Vektorkonstrukt in den Zielstamm elektroporiert. In diesem Stamm sollte die eigentliche Inframe-Deletion stattfinden.

Zunächst wurden 10 ml LB + Cm-Medium mit einem Klon des plasmidtragenden Zielstammes angeimpft und über Nacht bei 28° C im Schüttelinkubator bei 210 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10<sup>-3</sup>-, 10<sup>-4</sup>- und 10<sup>-5</sup>-Verdünnungen der Über-Nacht-Kultur in LB-Medium hergestellt. Jeweils 200 µl jeder Verdünnung wurden auf vorgewärmten Agarplatten ausplattiert. Von jeder Verdünnung wurden zwei Agarplatten bei 44° C und eine bei 28° C als Kontrolle für 24 h inkubiert. Waren auf den bei 44° C inkubierten Platten Kolonien zu finden, so war dies ein Zeichen dafür, dass bei diesen Klonen an einem der beiden Enden des zu modifizierenden Gens eine Rekombination mit dem homologen Sequenzabschnitt des Vektorkonstruktes stattgefunden hatte. Hierdurch hatte sich der gesamte Vektor in das Chromosom integriert und die Zelle somit resistent gegen den Cm-Marker gemacht. Zehn dieser Klone wurden noch einmal auf eine LB + Cm-Agarplatte ausgestrichen und wiederum bei 44° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB + Cm-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 28° C und 150 rpm inkubiert (Batch 1; aerophile Bedingungen). Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB + Cm-Medium mit 100 µl von Batch 1 beimpft und für 24 h bei 28° C und 150 rpm inkubiert (Batch 2; aerophile Bedingungen). Nach beendeter Inkubation wurde Batch 2 bei 4° C aufbewahrt. 50 ml LB + Cm-Medium wurden mit 100 µl von Batch 2 beimpft und für ca. sechs Stunden unter den genannten Bedingungen inkubiert (Batch 3). Auch Batch 3 wurde nach beendeter Inkubation bei 4° C aufbewahrt.

Durch die Inkubation bei 28° C repliziert der Vektor erneut und ist somit im Genom instabil. Durch eine weitere homologe Rekombination wird der Vektor wieder herausgeschnitten. Liegt dieses zweite Rekombinationsereignis am anderen Ende des Gens, so wird somit die Deletion auf das Chromosom gebracht.

Sowohl von Batch 2 als auch von Batch 3 wurden 10<sup>-6</sup>- und 10<sup>-7</sup>-Verdünnungen in LB-Medium hergestellt. 100 µl jeder Verdünnung wurden auf einer reinen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 44° C inkubiert, wobei pro Verdünnung zwei Platten präpariert wurden. Am nächsten Tag erfolgte eine Replikaplattierung aller Platten mit einer zählbaren Menge an Kolonien. Die Replikaplattierung erfolgte auf eine LB + Cm-Agarplatte, auf eine reine LB-Agarplatte und auf eine CR-Agarplatte. Die CR-Platte wurde anschließend bei 37° C, die anderen Platten bei 44° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten kontrolliert. Klone, die die gewünschte Inframe-Deletion trugen, zeigten den zu erwartenden Phänotyp auf der CR-Agarplatte und waren Cm-sensitiv, da der herausgeschnittene Vektor bei 44° C abgebaut worden war. Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wurden Klone mit den gewünschten Eigenschaften sowie einige Kontrollklone auf CR- und LB + Cm-Agarplatten übertragen. Behielten die entsprechenden Mutanten ihren Phänotyp und stellten sie sich wirklich als Cm-sensitiv heraus, so lagen hier mit großer Wahrscheinlichkeit die gewünschten Inframe-Deletionsmutanten vor. Dies wurde über PCR bestätigt. Drei der Klone, die ein PCR-Produkt der richtigen Größe zeigten, wurden als Glycerolstock konserviert (Methode nach RÖMLING 2001).

## II.10. Messung der Genexpression:

### II.10.1. $\beta$ -Galaktosidasetest:

Der MudJ-Vektor enthält neben seiner Km-Resistenzkassette zusätzlich ein promotorloses *lacZ*-Gen (MALOY ET AL., 1996; ZOGAY 1999). Mit dessen Hilfe kann über den Grad der Expression die Aktivität des Promotors eines Gens unter verschiedenen

Wachstumsbedingungen bestimmt werden, vorausgesetzt der MudJ-Vektor liegt in der richtigen Orientierung in diesem Gen vor (GERSTEL & RÖMLING 2001).

β-Galaktosidase-Enzypuffer (pH 7):

61 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,7	g
39 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,4	g
10 mM KCl	0,75	g
10 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,246	g
H <sub>2</sub> O	ad 1	l

Sterilisation durch Filtration

Arbeitspuffer (nicht älter als 7 Tage):

1 M DTT	40	μl
---------	----	----

zu 100 ml Enzypuffer; Lagerung bei 4° C

o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG; nicht älter als 7 Tage):

ONPG	0,1	g
------	-----	---

in 25 ml Enzypuffer aufnehmen; vor Licht schützen;  
Aufbewahrung bei -20° C

Auf Eis wurde eine Zellsuspension mit einer O.D.<sub>600nm</sub> von 0,4 – 0,5/ml Arbeitspuffer hergestellt. Je 2 x 10 μl, 30 μl und 100 μl dieser Bakteriensuspension wurden mit Arbeitspuffer auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurden zwei Tropfen Chloroform sowie 20 μl 0,1 %iges SDS in jedes Reaktionsgefäß gegeben und die Proben fünf Sekunden lang geschüttelt. Es folgte eine 5 – 10 min dauernde Inkubation bei Raumtemperatur.

Danach wurde die Reaktion gestartet. 0,2 ml ONPG wurden als Substrat für das Enzym hinzugefügt. Die Proben wurden gut geschüttelt und der Startzeitpunkt notiert. Es folgte eine Inkubation der Proben im Wasserbad bei 28° C bis die Proben eine deutlich gelbe Farbe zeigten (O.D.<sub>420nm</sub> = 0,1 – 0,4).

Dann konnte die Reaktion gestoppt werden, indem 0,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hinzugefügt wurden. Der Stoppzeitpunkt wurde ebenfalls notiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte in derselben Probenreihenfolge wie der Start, um bei allen Proben ungefähr die gleiche Reaktionszeit zu erhalten. Danach wurden jeweils 175 μl Reaktionsansatz in eine Öffnung einer ELISA-Platte gegeben und im ELISA-Reader die O.D. bei 420 nm, 550 nm und 660 nm gemessen. Als Maß für den Grad der β-Galaktosidaseaktivität wurden aus diesen Werten die Miller-Einheiten wie folgt berechnet:

$$\text{Miller-Einheiten (MU)} = 100 \times \text{O.D.}_{420\text{nm}} - 1,75 \times \text{O.D.}_{550\text{nm}} / t[\text{min}] \times V[\text{ml}] \times \text{O.D.}_{660\text{nm}}$$

## III. Ergebnisse:

### III.1. Phänotypdokumentation:

#### III.1.1. Untersuchung der Phänotypvariabilität bei verschiedenen *Escherichia coli*- und *Salmonella*-Wildtypstämmen:

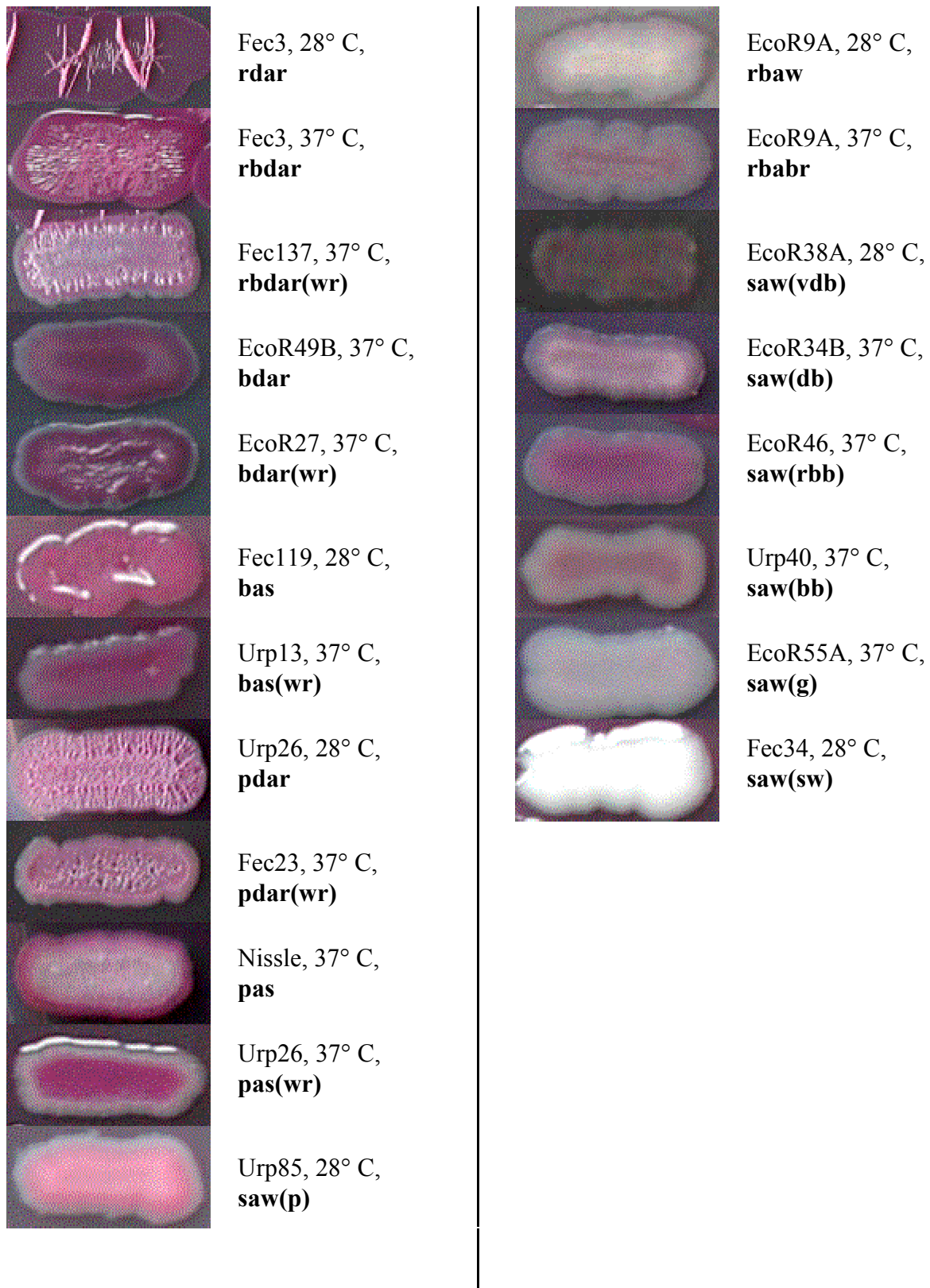
Die Expression der dünnen aggregativen Fimbrien und Zellulose kann im Stamm ATCC14028 auf Agarplatten durch die Expression verschiedener Morphotypen sichtbar gemacht werden. So zeigt eine Mutante, die nur dünne aggregative Fimbrien exprimiert, eine braune Koloniemorphologie (bdar-Morphotyp), eine Mutante, die ausschließlich Zellulose exprimiert, einen pinkfarbenen Morphotyp (pdar) und der Wildtyp, der beides exprimiert, eine violette Morphologie (rdar). Eine Mutante, die keine von beiden extrazellulären Komponenten exprimiert, ist weiß (saw; vgl. RÖMLING 2001).

Das Vorkommen der vom *S. Typhimurium*-Stamm ATCC14028 her bekannten Biofilmkomponenten Zellulose (RÖMLING 2002; ZOGAY ET AL., 2001) und dünne aggregative Fimbrien (COLLINSON ET AL., 1996; RÖMLING ET AL., 1998A und 2000) sollte auch bei Wildtypstämmen von *E. coli* und *Salmonella* untersucht werden. Hierfür wurden *E. coli*- und *S. Typhimurium*-Stämme unterschiedlicher Herkunft und von unterschiedlichen Isolierungsdaten auf verschiedene Phänotypen hin untersucht, welche auf CR- und CF-Platten ausgeprägt worden waren. Jeder isolierte Phänotyp wurde gesondert gesammelt, wobei jeweils zwei Klone pro Phänotyp aufbewahrt wurden. Kommensale *E. coli*-Stämme sowie einige Fäkalstämme anderer Bakterienspezies wurden direkt aus Ausscheidungen gesunder Versuchspersonen - wie in Kapitel II.5.8.2. beschrieben – isoliert (Fec-Stämme). *E. coli*-Stämme von Harnwegsinfektionen (Urp-Stämme) wurden nach Über-Nacht-Inkubation direkt aus dem städtischen Krankenhaus abgeholt und ebenso wie die Fäkalisolate aufgearbeitet (s. Kapitel II.5.8.3.).

Die EcoR-Sammlung (OCHMAN & SELANDER 1984) besteht aus 72 Stämmen, hauptsächlich Harnwegs isolate und kommensale Isolate. Diese Sammlung wurde im Jahre 1983 zusammengestellt. Die *Salmonella*-LT-Sammlung (LILLENGEN 1948) besteht aus 21 pathogenen *S. Typhimurium*-Stämmen. Das Referenzzentrum für Enterobacteriaceae in Wernigerode stellte 22 verschiedene *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis*-Stämme, die zum größten Teil aus menschlichen Ausscheidungen (s. Anhang VII.A) stammten, zur Verfügung. Weiterhin wurden noch 10 *S. Typhimurium* var. Copenhagen-, 19 *S. Typhi*-, 32 *S. Gallinarum*-, 1 *S. Pullorum*-, 24 *S. Choleraesuis*-Stämme und 1 Laborstamm von *S. Abortusovis* untersucht. Alle Isolate wurden auf CR- und CF-Agarplatten ausplattiert bzw. ausgestrichen und die Phänotypen der einzelnen Klone bei 28° C und 37° C anhand von Strichkulturen dokumentiert. Die Isolate aus Wernigerode waren bereits vereinzelt worden und konnten somit direkt als Strichkultur aufgetragen werden.

Abb. 9 zeigt die verschiedenen aufgetretenen CR-Phänotypen bei *E. coli* und *Salmonella*. Auffällig ist die größere Diversität bei *E. coli* im Gegensatz zu *Salmonella*. Bei *E. coli* traten neben den vier bekannten Phänotypen verschiedene Zwischenstufen auf, was auf eine mögliche unterschiedliche Ausprägung der AgfA- und Zelluloseexpression hindeutete. Bei *Salmonella* war die Anzahl dieser Zwischenstufen deutlich geringer als bei *E. coli*. Auch fehlt hier der bekannte Phänotyp bdar. Alle aufgeführten Phänotypen wurden bei den einzelnen Klonen in den unterschiedlichsten Kombinationen bei 28° C und 37° C ausgeprägt. Die diesbezüglichen Primärdaten befinden sich in Anhang VII.A - E.







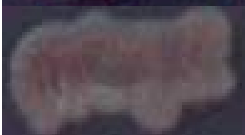



# Formenvariabilität bei *E. coli*



**Abb. 9:** Formenvariabilität an CR-Phänotypen bei *E. coli* und *Salmonella*: Zusätzlich gezeigt sind zwei ergänzende Phänotypen anderer Bakterienspezies. Eine Legende befindet sich auf der folgenden Seite.



# Formenvariabilität bei *Salmonella*

	4037/65, 37° C, <b>rdar</b>	<b><u>Legende:</u></b>  <u>Hauptphänotypen:</u>  rdar = red, dry and rough rbdar = redbrownish, dry and rough bdar = brown, dry and rough bas = brown and smooth pdar = pink, dry and rough pas = pink and smooth saw = smooth and white rbaw = rough, big and white rbabr = rough, big and brownish  <u>Differenzierte Beobachtung (in Klammer):</u>  wr = white rim g = grey dg = dark grey bb = bright brownish rbb = reddish bright brownish db = dark brownish vdb = very dark brownish p = pinkish sw = snow white rsw = reddish snow white
	4020/69, 28 ° C, <b>rbdar</b>	
	LT7A, 28° C, <b>bas</b>	
	4026/62, 37° C, <b>pdar</b>	
	LT18A, 37° C, <b>pas</b>	
	00-02114, 28° C, <b>saw(p)</b>	
	98-05543, 28° C, <b>saw(db)</b>	
	63-00914 , 28° C, <b>saw(rbb)</b>	
	3874/74, 28° C, <b>saw(bb)</b>	
	90-00659, 28° C, <b>saw(g)</b>	

## Ergänzende Phänotypen anderer Spezies:



*Proteus mirabilis*,  
Fec162, 28° C,  
**saw(dg)**



*Klebsiella spec.*,  
Fec164, 28° C,  
**saw(rsw)**

### III.1.2. Korrelation von Phänotyp und molekularen Befunden:

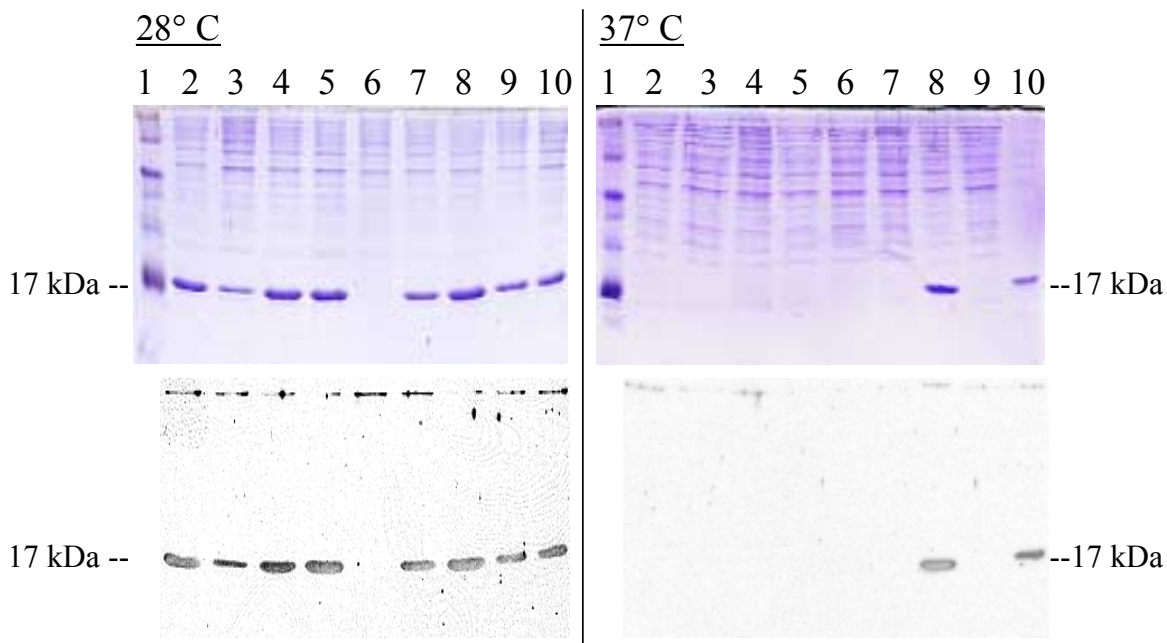
Um zu überprüfen, inwieweit ein bestimmter Phänotyp den Grad an AgfA- und Zellulose-Expression widerspiegelt, wurden diese beiden Substanzen bei ausgewählten *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen auf molekularer Ebene detektiert und dem jeweiligen Phänotyp gegenübergestellt.

#### III.1.2.1. Der AgfA-Nachweis:

AgfA wurde nach einem Anreicherungsverfahren (s. Kapitel II.6.3.1.) im Coomassie-Gel, im Western Blot und über Massenspektrometrie detektiert.

##### III.1.2.1.1. Coomassie-Gel und Western Blot:

Im Coomassie-Gel und Western Blot zeigte AgfA ein typisches Signal bei 17 kDa. Die Abb. 10 zeigt eine Beispielserie.



**Abb. 10:** AgfA-Signale bei 17 kDa im Coomassie-Gel (oben) und Western Blot (unten) jeweils für 28° C und 37° C derselben Stammserie (Phänotypangaben: 28° C/37° C): **1:** Marker (Novex); **2:** *S. Typhimurium* 00-03876/71 rbdar/saw(bb); **3:** *S. Typhimurium* 00-03876/72 rdar/saw(bb); **4:** *S. Enteritidis* 00-04026/62 rdar/pdar; **5:** *S. Typhimurium* 00-04037/65 rbdar/saw(bb); **6:** *S. Typhimurium* 00-04012/67 saw(bb)/saw(bb); **7:** *S. Typhimurium* 00-04013/68 rbdar/saw(bb); **8:** *S. Enteritidis* 97-00728/26 rdar/rdar; **9:** *S. Enteritidis* 97-00728/28 rbdar/saw(bb); **10:** *S. Typhimurium* MAE 52 rdar/rdar

Deutlich ist hier eine AgfA-Anreicherung in den Proben zu erkennen. So ist das AgfA-Signal bei den Proben, die ein positives Ergebnis zeigten, um ein Vielfaches stärker als die übrigen Proteinbanden. Darüber hinaus besteht eine direkte Korrelation zwischen AgfA-Signalstärke und Phänotyp des jeweiligen Stammes.

Die Ergebnisse des jeweils empfindlichsten Detektionsweges wurden als letztlisches Endergebnis für den jeweiligen Stamm angesehen. In der Regel war die Immunoblotdetektion die empfindlichste Methode und so wurden fast immer die mit dieser Methode erzielten Werte als letztendliches Ergebnis angenommen.

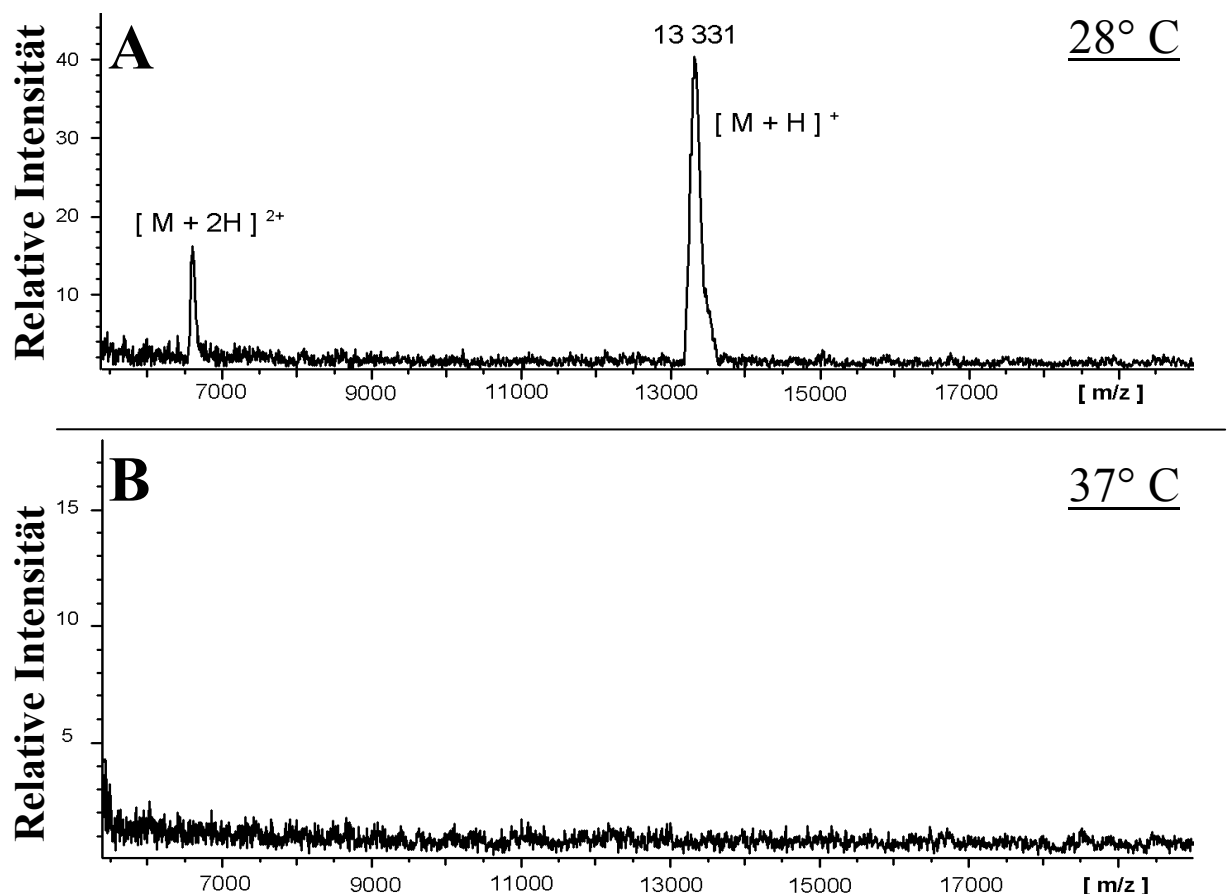
Für die Auswertung wurden verschiedene Abstufungen im Expressionsgrad von AgfA mit den Symbolen -, (+), +, ++ und +++ belegt, wobei - = überhaupt keine Expression und +++ = sehr starke Expression bedeuteten. In Abb. 11 sind diese Abstufungen am Beispiel des Blots verdeutlicht.



**Abb. 11:** Die fünf verschiedenen Abstufungen in der Stärke des AgfA-Signals am Beispiel des Blots: Von links nach rechts: -, (+); +; ++; +++

### III.1.2.1.2. MALDI/TOF-MS:

Das MALDI/TOF-MS-Hauptsignal von AgfA lag bei etwa 13,3 kDa anstelle von erwarteten 17 kDa im reifen Protein. Dies hing damit zusammen, dass eine 22 AS lange Sequenz am N-terminalen Ende säurelabil ist und somit bei Behandlung mit konzentrierter Ameisensäure hydrolytisch gespalten wird, während der Rest des Proteins säureresistent ist (COLLINSON ET AL., 1999). Die folgende Abb. 12 zeigt typische MALDI/TOF-MS-AgfA-Signale sowie die Messkurve einer Negativprobe.



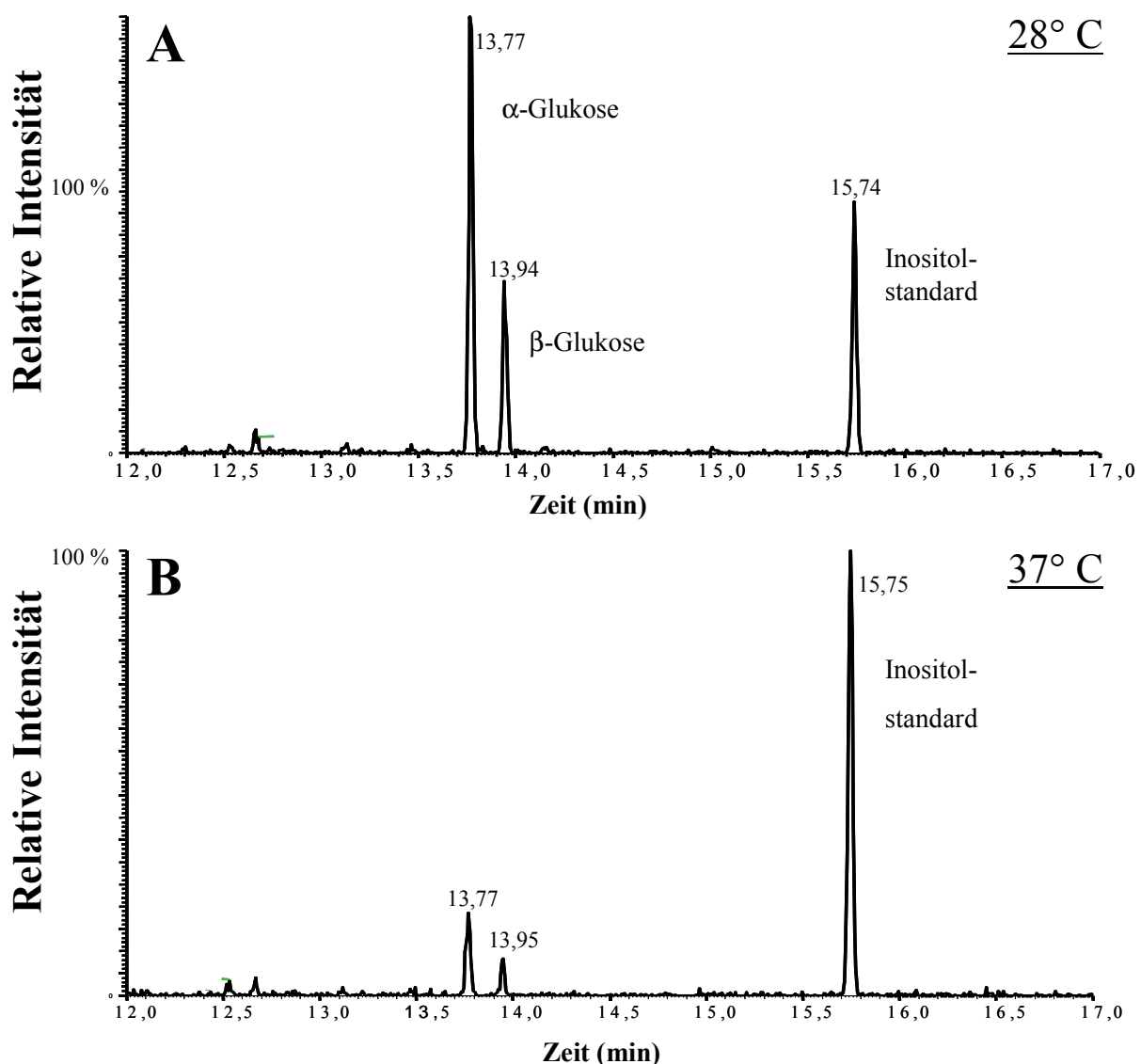
**Abb. 12:** MALDI/TOF-MS-Detektionskurven von 1:100-Verdünnungen des *S. Enteritidis*-Stammes 00-04026/64 bei 28° C (A) sowie bei 37° C (B): Gemäß des CR-Phänotyps rbdar/saw(bb) treten nur bei 28° C charakteristische AgfA-Signale von 6,3 bzw. 13,3 kDa in Erscheinung. Das zweite Signal stellt das AgfA-Hauptsignal dar. Das erste Signal beruht auf einer doppelten positiven Ladung. M + H bzw. M + 2H = Masse + ein bzw. zwei Protonen; m/z = Masse/Ladung

Da mit MALDI/TOF-MS nicht die Proteinmenge quantifiziert werden kann, wurden Verdünnungen von AgfA hergestellt. Die Menge an AgfA wurde semiquantitativ bestimmt, indem ermittelt wurde, bis zu welcher Verdünnung AgfA in den jeweiligen Proben nachzuweisen war. Auf diese Weise wurde zunächst der Versuch unternommen, eine

bakterienstammtypische Abstufung bezüglich des Grades der AgfA-Expression zu erstellen. Grundsätzlich erwies sich die Methode als zuverlässig. So war in der Regel bei Proben mit einem starken AgfA-Signal in Gel und Blot ein entsprechender AgfA-Hauptpeak im Spektrogramm bis zur  $10^{-4}$ -Verdünnung nachweisbar. Umgekehrt zeigten Proben ohne AgfA-Signal in Gel und Blot auch keine Signale im MALDI-Spektrogramm. Da aber die Messungen von verschiedenen Personen durchgeführt wurden und dieser Sachverhalt sich auch in der Qualität der Messungen widerspiegelte, wurde für die Gesamtauswertung auf die Resultate von Coomassie-Gel und Western Blot zurückgegriffen. Die MALDI/TOF-MS-Ergebnisse konnten lediglich zur Unterstützung der Resultate aus Gel und Blot herangezogen werden.

### III.1.2.2. Der Zellulosenachweis:

Die Abb. 13 zeigt typische Chromatogramme jeweils für einen positiven und einen negativen Befund (Zellulosenachweis nach UPDEGRAFF 1969).



**Abb. 13:** Zellulosedetektionschromatogramme des *S. Typhimurium*-Stammes 00-04037/65 bei 28° C (**A**) und bei 37° C (**B**): Gemäß des CR-Gesamt-Phänotyps (28° C/37° C) rbdar/saw(bb) treten die beiden charakteristischen Glukosepeaks lediglich bei 28° C auf. Der Inositolstandard ist bei beiden Präparationen gut zu erkennen.

Glukose als Grundbaustein der Zellulose zeigt zwei charakteristische Peaks bei einer Retentionszeit von 13,77 und 13,94 min entsprechend ihrer α- und β-Form (CHAPLIN &

KENNEDY 1996). Als Negativkontrolle diente die aufgearbeitete Probe einer Mutante, die keine Zellulose bilden konnte.

Für eine genaue Quantifizierung erwies sich die Methode insgesamt als zu ungenau. Ein Problem bei der Quantifizierung war, dass in einigen Proben immer noch Rest-Glukose aus anderen Quellen – z.B. Glykogen – vorhanden war, so dass selbst bei den Negativkontrollen kleine Glukosepeaks auftraten. So musste ein Grenzwert für positiv bzw. negativ festgelegt werden. Als Referenz wurde der Peak der  $\alpha$ -Form verwendet. War der Peak kleiner als 30 % bezogen auf den Peak des Inositolstandards so wurde der Test als negativ bewertet, war er größer oder gleich, als positiv.

### III.1.2.3. Expression von AgfA und Zellulose bei *Salmonella* und *E. coli*:

Ausgewählte *Salmonella*- und *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen Phänotypen wurden anhand der in den vorherigen Kapiteln genannten Methoden auf AgfA- und Zelluloseexpression hin untersucht.

**Tab. 9:** AgfA- und Zellosedetektion bei *Salmonella* und *E. coli*: Die Stärke des AgfA-Signals ist mit den Intensitätsstufen +++, ++, +, (+) und - angegeben, wobei +++ = besonders stark und - = kein Signal bedeuten. Phänotypen, die nicht mit einem oder mehreren Befunden in Verbindung gebracht werden konnten, sind in Fettdruck dargestellt; *S. Typhim. v. C.* = *S. Typhimurium* var. Copenhagen; nd = nicht durchgeführt

Spezies	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	AgfA (28° C/37° C)	Zellulose (28° C/37° C)
<i>S. Typhi</i>	00-02714	saw(g)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhi</i>	01-00176	saw(g)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhi</i>	01-00051	saw(g)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhi</i>	01-04943	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhi</i>	01-05989	saw(bb)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhi</i>	01-07794	<b>saw(db)/saw(db)</b>	-/-	nd/nd
<i>S. Typhi</i>	01-07795	saw(g)/ <b>saw(db)</b>	-/-	negativ/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	00-01048	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	98-04389	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	96-08742	saw(bb)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	96-02404	saw(bb)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	89-00655	<b>bas(wr)</b> /saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	86-00656	saw(p)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	63-00657	saw(g)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	61-00658	saw(bb)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>S. Choleraesuis</i>	90-00659	saw(g)/saw(g)	-/-	negativ/nd
<i>S. Abortusovis</i>	00318	saw(g)/saw(g)	nd/-	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-08774	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	negativ/negativ
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-07478	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-07087	saw(g)/saw(g)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-06699	saw(bb)/saw(g)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-06506	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-00672	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-00951	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	00-06356	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	99-08950	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	nd/nd
<i>S. Typhim. v. C.</i>	99-01184	saw(bb)/saw(bb)	-/nd	nd/nd
<i>S. Enteritidis</i>	00059/6	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Enteritidis</i>	00060/7	rdar/rdar	+++/>++	nd/nd
<i>S. Enteritidis</i>	97-00728/26	rdar/rdar	+++/>+++	nd/nd
<i>S. Enteritidis</i>	97-00728/28	rbdar/saw(bb)	++/>-	nd/nd
<i>S. Enteritidis</i>	00-04156/45	rbdar/saw(bb)	+++/>-	nd/nd
<i>S. Enteritidis</i>	00-04560/46	rbdar/saw(bb)	++/>-	nd/nd

<i>S. Enteritidis</i>	00-04026/62	rdar/pdar	+++/(+)	positiv/negativ
<i>S. Enteritidis</i>	00-04026/64	rbdar/saw(bb)	+++/-	positiv/negativ
<i>S. Typhimurium</i>	00-04037/65	rbdar/saw(bb)	+++/-	positiv/negativ
<i>S. Typhimurium</i>	00-04037/66	saw(bb)/saw(bb)	-/-	positiv/positiv
<i>S. Typhimurium</i>	00-04012/67	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-04013/68	rbdar/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-04020/69	rbdar/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-04020/70	saw(db)/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-03876/71	rbdar/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-03876/72	rdar/saw(bb)	+/-	positiv/positiv
<i>S. Typhimurium</i>	00-03874/73	rbdar/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-03874/74	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-03875/75	rbdar/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-03875/76	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-03924/43	rbdar/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	00-07081/44	rbdar/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT14A	saw(bb)/saw(bb)	-/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT14B	rdar/pas	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT14C	rbdar/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT14D	bas/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT14E	bas/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT14F	rbdar/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT21A	rdar/pas	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT21B	rdar/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT21C	rbdar/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT21D	saw(db)/saw(bb)	+/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT21E	bas/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT21F	bas/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>S. Typhimurium</i>	LT21G	rbdar/saw(bb)	+++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp1	saw(g)/saw(g)	-/-	positiv/negativ
<i>E. coli</i>	Urp5	saw(bb)/saw(g)	-/-	negativ/negativ
<i>E. coli</i>	Urp13	rdar/bas(wr)	+/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp19	bdar/saw(g)	++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp20	rdar/saw(bb)	+++/-	positiv/negativ
<i>E. coli</i>	Urp22	rbdar/saw(bb)	++/-	positiv/negativ
<i>E. coli</i>	Urp26	pdar/pas(wr)	+++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp28	rdar/pdar	+++/-	negativ/positiv
<i>E. coli</i>	Urp30	pdar/pas(wr)	++/-	positiv/negativ
<i>E. coli</i>	Urp40	saw(bb)/saw(db)	-/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp41	saw(db)/saw(g)	+/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp45	bdar/bdar	+++/>++	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp49	rbdar/saw(g)	+/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp55	rdar/saw(bb)	++/(+)	positiv/negativ
<i>E. coli</i>	Urp57	rdar/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Urp59	rbdar(wr)/saw(bb)	(+)/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec3	rdar/rbdar	++/+	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec5	rdar/pdar	++/(+)	positiv/positiv
<i>E. coli</i>	Fec6	bdar/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec10	rdar/saw(bb)	++/-	positiv/negativ
<i>E. coli</i>	Fec12	rdar/rdar	++/+++	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec23	rdar/pdar(wr)	+++/>++	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec26	rdar/pas(wr)	+++/>+++	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec34	saw(sw)/saw(sw)	-/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec38	bdar/saw(bb)	+/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec41	rdar/bas	++/>++	positiv/positiv
<i>E. coli</i>	Fec51	rdar/rbdar	++/>+	positiv/nd
<i>E. coli</i>	Fec53	saw(g)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec55	bdar/saw(db)	++/-	nd/negativ
<i>E. coli</i>	Fec59	rdar/rdar	++/>++	positiv/positiv

<i>E. coli</i>	Fec61	saw(sw)/saw(sw)	-/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec65	bdar/bdar(wr)	+/+	nd/negativ
<i>E. coli</i>	Fec67	rdar/rdar	++/++	positiv/positiv
<i>E. coli</i>	Fec69	bdar/ <b>bas</b>	++/(+)	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec75	saw(g)/saw(g)	-/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec81	rbdar/bas(wr)	++/++	negativ/negativ
<i>E. coli</i>	Fec89	rdar/pdar	+++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec91	rbdar/bas(wr)	++/++	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec93	bdar/saw(g)	++/(+)	negativ/nd
<i>E. coli</i>	Fec95	rbdar/saw(g)	++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec97	rbdar/bdar	++/++	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec98	pdar/saw(p)	++/-	positiv/negativ
<i>E. coli</i>	Fec99	rbdar/saw(g)	++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec101	rdar/rdar	++/++	positiv/positiv
<i>E. coli</i>	Fec108	rbdar/bdar	++/++	positiv/nd
<i>E. coli</i>	Fec110	<b>bdar</b> /saw(g)	(+)/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec112	rdar/rdar	+++/++	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec114	<b>bas</b> /saw(bb)	(+)/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Fec119	bas/saw(bb)	+/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	Nissle 1917	<b>pdar</b> /pas	++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	<i>AbcsA</i>	bas/saw(bb)	++/-	nd/nd
<i>E. coli</i>	<i>DagfD</i>	pdar/pdar	(+)/-	nd/nd

Die Ergebnisse der AgfA-Detektion in Tab. 9 zeigen, dass die Befunde in der deutlichen Mehrzahl der Fälle mit den jeweiligen Phänotypen korrelierten. Lediglich ein paar Ausnahmen deuten darauf hin, dass nicht in jedem Fall vom CR-Phänotyp auf den Grad der AgfA-Expression geschlossen werden kann. So beruht die etwas dunklere Färbung des saw(db)-Phänotyps des *S. Typhi*-Stammes 01-07794 möglicherweise auf der Ausbildung anderer Oberflächenelemente an Stelle von dünnen aggregativen Fimbrien. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass etwa die Hälfte der Stämme mit einem pdar- oder pas-Phänotyp, z.B. Urp26 und Fec26, die eigentlich erwartungsgemäß keine aggregativen Fimbrien ausbilden sollten, teilweise sehr starke AgfA-Signale aufwiesen. Dies zeigt, dass eine hohe Zelluloseproduktion AgfA-Expression überdecken kann.

Die Ergebnisse der Zellulosemessungen sind zu etwa 80 % ebenfalls phänotypkonform (s. Tab. 9). In den Fällen, in denen es Abweichungen gibt, liegen höchstwahrscheinlich methodische Fehler vor. Diese Problematik wurde in Kapitel III.1.2.2. bereits angesprochen. Fest steht, dass in keinem Fall andere Grundbausteine als Glukose nachgewiesen werden konnten. Sieht man einmal von möglichen Verunreinigungen durch Restglykogen ab, so ist dies ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die calcofluorbindende Substanz der extrazellulären Matrix - zumindest bei den getesteten Bakterienstämmen – wirklich Zellulose war (s. hierzu Kapitel III.1.2.5.).

### III.1.2.4. Phänotypvergleich zwischen den einzelnen *Salmonella*-Gruppierungen:

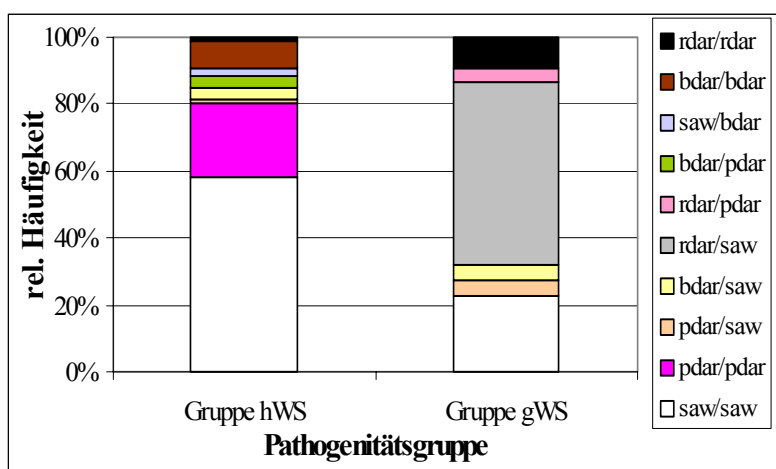
Die *Salmonella*-Serotypen der Wernigeroder Sammlung lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen, nämlich in Serotypen, die spezifisch nur eine bestimmte Wirtsspezies befallen und in Serotypen, die ein breites Wirtsspektrum haben. *S. Typhi*, *S. Gallinarum*, *S. Choleraesuis* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen gehören der ersten Gruppierung an (RABSCH ET AL., 2002). So stammen alle *S. Typhi*-Stämme ausnahmslos aus menschlichen Ausscheidungen. Die *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme sind allesamt Taubenstämme und *S. Gallinarum* sowie *S. Pullorum* kommen nahezu ausschließlich bei Hühnern vor. *S. Choleraesuis* befällt überwiegend Schweine, wird aber auch regelmäßig in Proben anderer



Herkunft gefunden (s. Anhang VII.A). Somit ist bei *S. Choleraesuis* die Wirtsspezifität unter den Stämmen dieser Gruppierung offensichtlich am geringsten.

Die zweite Gruppierung setzt sich aus den *S. Enteritidis*- und *S. Typhimurium*-Stämmen zusammen. Diese Stammgruppierung zeichnet sich durch geringe Spezifität bezüglich ihrer Wirtsspezies aus. Darüber hinaus werden Vertreter dieser Gruppierung auch regelmäßig in aus der Umwelt stammenden Proben, z.B. im Trinkwasser und in Lebensmitteln (GUGNANI 1999; THORNS 2000), gefunden.

Die verschiedenen CR-Phänotypen beider Gruppierungen sind im Folgenden einander gegenübergestellt. Hierfür wurde jeweils die Auftrittshäufigkeit des Phänotyps eines Stammes gleich 100 % gesetzt. Die einzelnen Auftrittshäufigkeiten der entsprechenden Phänotypen wurden aufaddiert und durch die Anzahl der Stämme dividiert. Die molekularen Daten wurden insoweit berücksichtigt, als z.B. ein Stamm, der bei einer bestimmten Temperatur den Phänotyp saw(db) zeigte, aber bei dem das Vorhandensein von dünnen aggregativen Fimbrien über AgfA-Detektion nicht nachgewiesen werden konnte, als saw(bb) angesehen wurde.



**Abb. 14:** Relative Auftrittshäufigkeit der einzelnen Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) bei den beiden *Salmonella*-Pathogenitätsgruppen hWS (hohe Wirtsspezifität) und gWS (geringe Wirtsspezifität): Die einzelnen Phänotypen wurden zu folgenden vier Gruppen zusammengefasst: 1. rdar: rdar, rbdar; 2. bdar: bas, saw(db); 3. pdar: pdar, pas, saw(p), saw(rbb); 4. saw: saw(bb), saw(g)

Beim Vergleich der Phänotypauftrittshäufigkeiten beider Pathogenitätsgruppen fällt auf, dass die Vertreter der Gruppe mit hoher Wirtsspezifität zu beinahe 60 % den Phänotyp saw/saw aufwiesen. Der tatsächliche Anteil war höchstwahrscheinlich noch höher. So rekrutierten sich die bdar/bdar-Phänotypen überwiegend aus *S. Gallinarum*-Stämmen mit dem Phänotyp saw(db)/saw(db). Ähnliches galt für die pdar/pdar-Phänotypen, die sich nahezu alle aus *S. Gallinarum*-Stämmen mit dem Phänotyp saw(rbb)/saw(rbb) zusammensetzten. Allerdings konnte bei der Mehrzahl dieser Stämme Calcofluorbindung nachgewiesen werden (s. Kapitel III.1.2.5.; vgl. Anhang VII.A). Es lag also offensichtlich zu einem gewissen Grad Zelluloseproduktion vor. Die übrigen Phänotypen waren bei der Gruppe mit hoher Wirtsspezifität lediglich mit verschwindend geringen Anteilen vertreten.

Bei der Gruppe mit geringer Wirtsspezifität war der Phänotyp rdar/saw mit über 50 % am häufigsten vertreten. Der Phänotyp rdar/rdar war hier mit 10 % ebenfalls recht anteilsstark. Der eigentliche Anteil an rdar/rdar war jedoch viel geringer, da die Stämme nicht repräsentativ ausgewählt wurden.

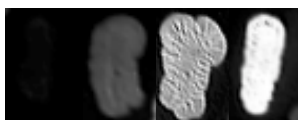
So wurden in Wernigerode ursprünglich mehr als 800 *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis*-Stämme auf ihren Phänotyp hin untersucht. Über 90 % dieser Stämme zeigten einen rdar/saw-Phänotyp und weniger als 0,75 % den rdar/rdar-Phänotyp. Die restlichen 10 % zeigten einen saw/saw-Phänotyp. Da es sich bei diesen Stämmen jedoch um *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme handelte, waren sie der Gruppe mit hoher Wirtsspezifität zuzurechnen (vgl. RÖMLING ET AL., 2003).



### III.1.2.5. Korrelation von CF-Bindungsgrad und CR-Phänotyp:

Calcofluor (CF) ist ein Farbstoff, der an 1-4 und 1-3  $\beta$ -Glukane, also auch an Zellulose – ein  $\beta$ -1-4-Glukan –, bindet (ZOGAY ET AL., 2001). Bakterienstämme, die Zellulose produzieren und auf einer Calcofluorplatte ausgestrichen worden sind, fluoreszieren bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 366$  nm.

Je nach CF-Bindungsgrad fluoreszierten die Bakterienstämme unterschiedlich stark. Der CF-Bindungsgrad wurde in vier Stufen -, (+), + und ++ beurteilt, wobei ++ = besonders starke Fluoreszenz und - = überhaupt keine Fluoreszenz bedeuteten.



**Abb. 15:** Die vier Abstufungen im CF-Bindungsgrad: Von links nach rechts: -; (+); +; ++

Bei einigen Stämmen war der Rand der Strichkultur heller gefärbt als das Zentrum. In diesen Fällen wurde der Fluoreszenzgrad des Zentrums als CF-Phänotyp dokumentiert. Zusätzlich wurde das Symbol in Pfeilkammern gesetzt, um zu zeigen, dass der Rand der nächsthöheren Fluoreszenzstufe entsprach. Zum Beispiel bedeutete das Symbol  $<(+)>$ , dass das Zentrum der Strichkultur der Stufe (+) entsprach, der Rand hingegen der Stufe +. Ein solcher CF-Bindungsphänotyp wies darauf hin, dass die Zelluloseproduktion von Zellen einer Kolonie bzw. Strichkultur heterogen war.

Auf CR-Platten erschienen Zellen mit reiner Zelluloseproduktion pink, Zellen, die nur AgfA produzierten, dagegen braun. Intermediäre Phänotypen wiesen auf eine Produktion beider Komponenten hin, wobei hier eine diesem Phänotyp gerecht werdende entsprechende Expressionsstärke einer der beiden Substanzen gegenüber der anderen zu erwarten war. So deutete beispielsweise der Phänotyp rbdar auf eine starke AgfA- und eine niedrige Zelluloseproduktion hin. In Tab. 10 sind alle bei *E. coli* und *Salmonella* aufgetretenen CR-Phänotypen und CF-Bindungsgrade den jeweiligen molekularen Ergebnissen gegenübergestellt.

**Tab. 10:** Bei allen getesteten *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen aufgetretene CF-Bindungsgrade: Die in schwarz gedruckten Symbole stellen die häufig auftretenden Varianten dar, bei den grau gedruckten handelt es sich lediglich um wenige Einzelfälle. Eckige Klammern weisen darauf hin, dass die entsprechenden Phänotypen nicht auf molekularer Ebene untersucht wurden; pos. = positiv; neg. = negativ

CR-Phänotypen (s. Abb. 9)	CF-Bindungsgrade	Molekulare Daten
rdar	+, $<(+)>$ , (+)	viel AgfA, Zellulose pos.
rbdar, rbdar(wr)	++, +, $<(+)>$ , (+), $<(-)>$	viel AgfA, Zellulose pos.
bdar, bdar(wr), bas, bas(wr)	++, +, (+), $<->$ , -	viel AgfA, Zellulose neg.
pdar, pdar(wr), pas, pas(wr)	++, +, (+), -	wenig AgfA, Zellulose pos.
saw(db), [saw(vdb)]	+, (+), $<->$ , -	wenig AgfA, Zellulose neg.
saw(p), [saw(rbb)]	+, (+)	kein AgfA, Zellulose neg.
saw(g), saw(bb)	+, (+), $<->$ , -	kein AgfA, Zellulose neg.
saw(sw)	-	kein AgfA, Zellulose neg.
[rbabr, rbaw]	(+), -	-

Der Vergleich des CR-Phänotyps mit seinen jeweiligen häufig auftretenden CF-Bindungsgradvarianten und den entsprechenden molekularen Daten zeigt, dass sich die Ergebnisse gut ergänzen. CR-Phänotypen wie bdar oder saw(g), die auf Grund ihrer CR-Färbungsgrades auf das Vorhandensein von sehr wenig bis gar keiner Zellulose schließen ließen, banden so gut wie kein Calcofluor. Dies bestätigten auch molekulare Daten.

Desweiteren kam der Phänotyp pdar bzw. pas, der das Vorhandensein von viel Zellulose erwarten ließ, hauptsächlich in den Varianten ++ und + vor, was ebenfalls durch molekulare Daten untermauert werden konnte.

Beim Phänotyp rdar überlagerten dünne aggregative Fimbrien teilweise die Fluoreszenz. Deswegen zeigte dieser Phänotyp lediglich den CF-Bindungsgrad + als höchste Stufe.

Um künftig mehr Transparenz bei der Phänotypangabe zu erreichen, werden im Folgenden CR- und CF-Phänotyp für jeden Stamm gemeinsam angegeben, z.B. rdar+/rdar+ als Gesamt-Phänotyp (28° C/37° C) für den *E. coli*-Stamm Fec67.

### III.1.2.6. Phänotypen anderer Spezies:

Neben *E. coli* traten in den Fäkalproben auch andere Spezies in geringer Zahl auf. Die Phänotypen, die bei den einzelnen Spezies auftraten, sind in Tab. 11 zusammengestellt.

**Tab. 11:** Zusammenstellung aller neben *E. coli* aus Fäkalproben isolierten Bakterienspezies und ihrer Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C): Stämme mit der Bezeichnung „spec.“ konnten nicht näher bestimmt werden.

Spezies	Phänotyp (28° C/37° C)
<i>Citrobacter spec.</i>	bdar-/saw(g)-
<i>Citrobacter freundii</i>	bdar-/saw(g)-
<i>Citrobacter kos./farmeri</i>	saw(db)+/saw(db)(+)
<i>Enterobacter spec.</i>	pdar++/pas++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	pdar+/pdar++
<i>Enterobacter cloacae</i>	saw(bb)-/saw(p)+; saw(p)-/pas-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	pdar++/pdar++
<i>Klebsiella spec.</i>	saw(sw)-/saw(sw)-; saw(rsw)-/saw(p)-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	saw(sw)-/saw(sw)-; saw(sw)-/saw(p)+
<i>Klebsiella pneumonia</i>	saw(sw)-/saw(sw)-; saw(p)+/saw(p)++
<i>Klyvera spec.</i>	saw(g)-/saw(bb)(+); saw(p)+/saw(p)(+)
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	saw(sw)-/saw(sw)-
<i>Proteus mirabilis</i>	saw(dg)(+)/saw(dg)(+)

Wie aus Tab. 11 ersichtlich, traten bei diesen Spezies mit zwei Ausnahmen (s. Abb. 9) gleiche Phänotypen auf wie bei *E. coli*, was darauf hindeutet, dass auch bei diesen Stämmen AgfA und Zellulose als Hauptbiofilmkomponenten eine Rolle spielen. Dieser Sachverhalt konnte durch ZOGAJ ET AL., 2003 bestätigt werden.

Die hier aufgeführten Bakterienspezies sollen jedoch hier nicht weiter betrachtet werden. Eine ausführliche Tabelle, in der die Auftrittshäufigkeiten der einzelnen Stämme bezogen auf die Gesamtzahl aller Bakterienspezies pro Stuhlprobe aufgelistet sind, befindet sich in Anhang VII.H.

### III.1.3. Häufigkeitsverteilung der Phänotypen bei den einzelnen Stammgruppen:

In Kapitel III.1.2. konnte für *E. coli* und *Salmonella* nachgewiesen werden, dass anhand des CR-Phänotyps und des CF-Bindungsgrades in der Regel durchaus auf den Grad der AgfA- und Zelluloseproduktion geschlossen werden konnte. Diesbezügliche Ausnahmen waren lediglich bei den Phänotypen pdar, pas und saw(db) zu finden.

In diesem Kapitel wird auf die Phänotypdiversität bestimmter Stammgruppen sowie auf die relative Auftrittshäufigkeit bestimmter Phänotypen bei diesen eingegangen.

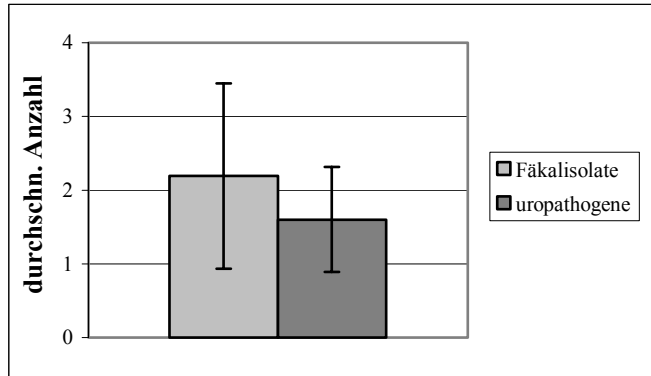
#### III.1.3.1. Phänotypdiversität und Auftrittshäufigkeit bei frischen *E. coli*-Isolaten:

Aus Stuhlproben von 21 gesunden Versuchspersonen sowie aus Urin von 15 Patienten mit Harnwegsinfektionen wurden *E. coli*-Stämme isoliert. Sowohl bei den Fäkalisolaten als auch bei den uropathogenen Stämmen konnten verschiedene Phänotypen isoliert werden. Häufig

befanden sich auch *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen Phänotypen innerhalb einer Probe. Im Folgenden werden die entsprechenden Ergebnisse beider Stammgruppen einander gegenübergestellt.

#### III.1.3.1.1. Durchschnittliche Anzahl von Phänotypen:

Abb. 16 zeigt die durchschnittliche Anzahl von Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Probe jeweils für die beiden Stammgruppen Fäkalisolate und uropathogene Stämme.



**Abb. 16:** Durchschnittliche Anzahl von Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Probe, gezeigt für frisch isolierte kommensale und uropathogene *E. coli*-Stämme

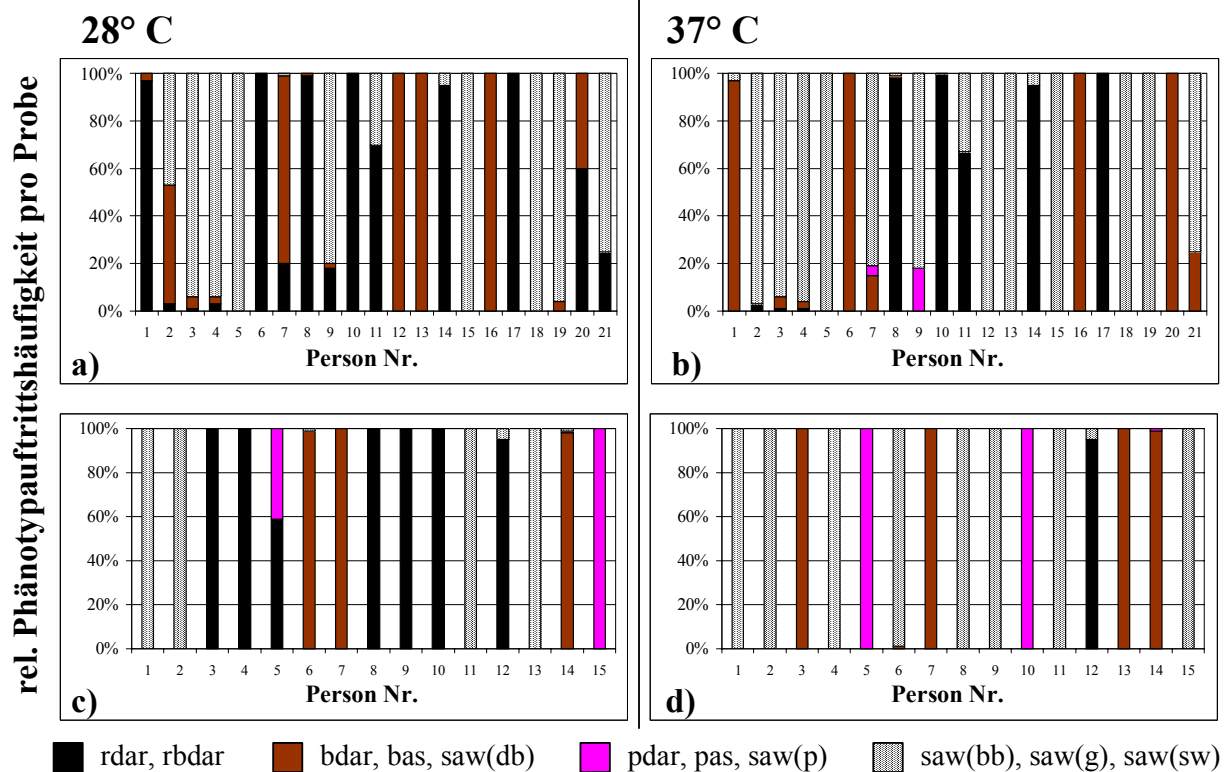
Die Standardabweichungen implizieren, dass zwischen den Durchschnittswerten beider Gruppen kein signifikanter Unterschied bestand.

#### III.1.3.1.2. Vergleich der Phänotypdiversität bei Fäkalisolaten und uropathogenen *E. coli*-Stämmen:

Unterschiede in der durchschnittlichen Anzahl von Phänotypen pro Fäkal- bzw. Urin-Abstrichprobe waren nicht nachweisbar. An dieser Stelle wird nun untersucht, ob Unterschiede in der Art der auftretenden Phänotypen zwischen beiden Stammgruppen bestanden. Abb. 17 zeigt eine Gegenüberstellung der Auftrittshäufigkeiten der Teilphänotypen jeweils für 28° C und 37° C bei kommensalen und uropathogenen *E. coli*-Stämmen. Hierfür wurden ähnliche Phänotypen zu Gruppen zusammengefasst.

Beim Vergleich der Diagramme miteinander fällt sofort das deutlich heterogenere Bild der Fäkalisolatdiagramme gegenüber denen der uropathogenen Stämme auf. So war bei den uropathogenen *E. coli*-Stämmen in der Regel lediglich ein Phänotyp pro Probe vertreten, während die Fäkalisolate häufiger zwei bis drei verschiedene Phänotypen pro Probe zeigten.

Auch bei der Auftrittshäufigkeit der einzelnen Phänotypen wurden zwischen beiden Stammgruppen Unterschiede festgestellt. So trat der Phänotyp *rdar* bei den uropathogenen Stämmen bei 37° C nur in einem einzigen Fall in nennenswerten Anteilen in Erscheinung. Der Phänotyp *bdar* hingegen, der für die Produktion dünner aggregativer Fimbrien steht, war bei beiden Stammgruppen etwa gleichhäufig vertreten. Der Phänotyp *pdar*, der Zelluloseproduktion verkörpert, war bei beiden Temperaturen bei den uropathogenen Stämmen deutlich häufiger vertreten als bei den Fäkalisolaten.



**Abb. 17:** Relative Auftretshäufigkeit der einzelnen Phänotypen in jeder Probe bei frischen *E. coli*-Isolaten: Die Ergebnisse sind für 28° C und 37° C getrennt dargestellt; **a), b):** Fäkalisolate; **c), d):** uropathogene Stämme

### III.1.3.1.3. Prozentuale Anteile der AgfA- und der zelluloseproduzierenden Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) bei *E. coli*:

Anhand der CR-Phänotypen und des CF-Bindungsgrades wurde eine Einteilung in AgfA- und in zelluloseexprimierende Phänotypen vorgenommen:

AgfA<sup>+</sup>-Phänotypen: rdar, rbdar, bdar, bas, saw(db) und deren Variationen

AgfA<sup>-</sup>-Phänotypen: pdar, pas, saw(p), saw(bb), saw(g), saw(sw) und deren Variationen

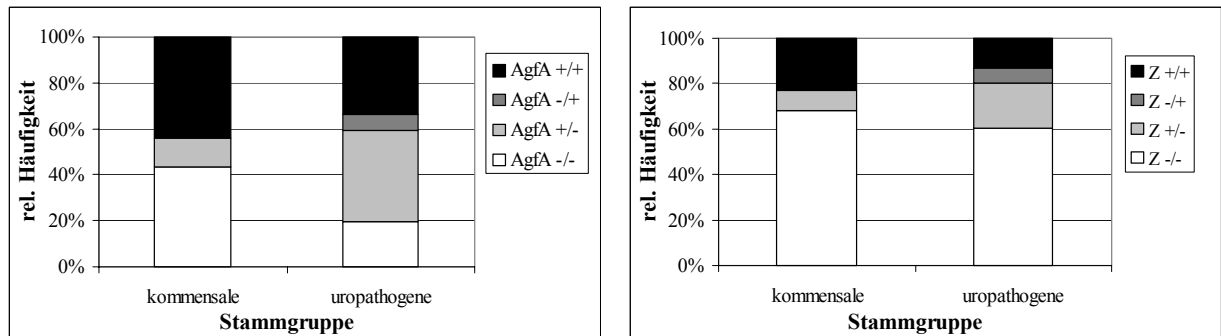
Für pdar, pas, bas und saw(db) war auf Grund der molekularen Daten eine eindeutige Zuordnung zu den AgfA<sup>+</sup>- bzw. AgfA<sup>-</sup>-Phänotypen problematisch. Für die nachfolgende Betrachtung wurden die entsprechenden Fälle mit den besagten Phänotypen, bei denen wider Erwarten ein AgfA-Signal auftrat, was einer höheren Detektionsstufe als (+) entsprach, entgegen der obigen Einteilung zu den AgfA<sup>+</sup>-Phänotypen gerechnet. Dasselbe galt in umgekehrter Weise für rbdar, bdar, bas und saw(db). War hier die AgfA-Detektionsstufe niedriger oder gleich (+), so wurden die entsprechenden Einzelfälle zu den AgfA<sup>-</sup>-Phänotypen gerechnet.

Zellulose<sup>+</sup>-Phänotypen: CF-Bindungsgrad von ++, + und <(+)>

Zellulose<sup>-</sup>-Phänotypen: CF-Bindungsgrad von (+), <-> und -

Da die Zellulosedetektion mittels der Updegraff-Methode und anschließender Gaschromatographie nur sehr grobe Anhaltspunkte bezüglich des Zellulose-Expressionsgrades lieferte und darüber hinaus verglichen mit den AgfA-Daten relativ wenig Messdaten vorlagen, erhielt sie bei dieser Auswertung keinerlei Gewicht.

Aus den genannten vereinfachten Einzelphänotypen wurden die Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) zusammengesetzt und die prozentuale Häufigkeit derselben bei Fäkalisolaten und uropathogenen Stämmen für die nachfolgende Betrachtung einander gegenübergestellt. Als Maß für die Gesamthäufigkeit des Auftretens der einzelnen Phänotypen diente das arithmetische Mittel der prozentualen Einzelhäufigkeiten bezogen auf die Gesamtzahl der Versuchspersonen. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt.



**Abb. 18:** Relative Auftretshäufigkeit der einzelnen AgfA- bzw. Zellulose-Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) für die frisch isolierten kommensalen und uropathogenen *E. coli*-Stämme: Eine Erklärung der AgfA- bzw. Zellulose-Phänotypen befindet sich im Text. links: AgfA; rechts: Zellulose (Z)

Bei Betrachtung der Diagramme lassen sich bezüglich des AgfA- und Zelluloseexpressionsgrades keine signifikanten Unterschiede zwischen kommensalen und uropathogenen *E. coli*-Stämmen feststellen. So beträgt der Anteil an Stämmen, die bei 37° C AgfA exprimieren, bei beiden Stammgruppen ungefähr 40 %. Der Anteil an Stämmen, die bei 37° C Zellulose produzieren, ist mit ungefähr 20 % ebenfalls bei beiden Stammgruppen gleich. Folglich ist hier kein Zusammenhang des AgfA- bzw. Zelluloseproduktionsgrades von dem Grad der Pathogenität erkennbar.

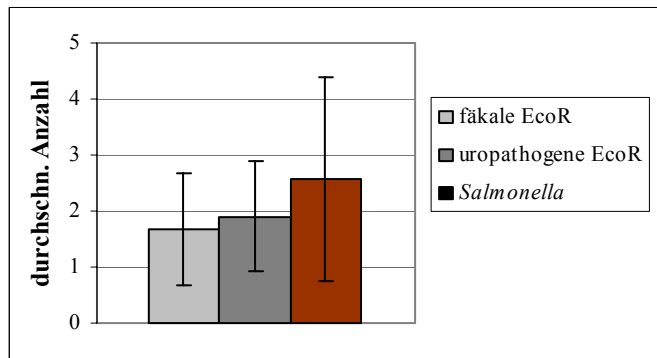
### III.1.3.2. Phänotypdiversität und Auftretshäufigkeit bei EcoR- und LT-Sammlung:

Nach der Untersuchung der frischen Isolate werden nun im Folgenden die Verhältnisse bei den beiden alten Stammsammlungen untersucht. Die einzelnen Stämme waren im Vorfeld dieser Arbeit als Agarstichkulturen bezogen und anschließend zur Herstellung von Glycerolstocks großflächig auf Agarplatten ausgestrichen und angezogen worden. Eine erneute Vereinzelung durch das Abnehmen und Ausstreichen von Einzelklonen wurde vor der Herstellung der Glycerolstocks nicht durchgeführt, da anzunehmen war, dass eine solche Vereinzelung vor dem Verschicken bereits erfolgt war. Somit war zu erwarten, dass jeder einzelne Stamm lediglich einen stammtypischen Phänotyp aufwies.

#### III.1.3.2.1. Durchschnittliche Anzahl von Phänotypen pro Stamm:

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die einzelnen Stämme bereits als Glycerolstocks vor. Obwohl davon auszugehen war, dass ursprünglich sauber vereinzelter Klone der entsprechenden Bakterienstämme bezogen worden waren, konnten bei den genannten Stammsammlungen bis zu sechs verschiedene Phänotypen aus einem Glycerolstock isoliert werden. Offensichtlich waren während der jahrzehntelangen Lagerung innerhalb einzelner Stämme zahlreiche Mutanten entstanden. Eine lückenlose Dokumentation bezüglich der Bedingungen, unter denen die einzelnen Stämme über diesen Zeitraum gelagert worden waren, lag nicht vor. Ausführliche Tabellen bezüglich der Phänotypdiversität bzw. der entsprechenden Auftretshäufigkeit der Phänotypen in jeder Probe befinden sich in Anhang VII.I - K.

Eine interessante Frage war nun, ob Unterschiede zwischen den drei Stammgruppen kommensale *E. coli*-Stämme, uropathogene *E. coli*-Stämme und pathogene *S. Typhimurium*-Stämme im Hinblick auf die Phänotypdiversität bestanden. Abb. 19 zeigt die durchschnittliche Anzahl von Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Probe jeweils für folgende Stammgruppen: kommensale EcoR-Fäkalstämme, uropathogene EcoR-Stämme und pathogene LT-Stämme.

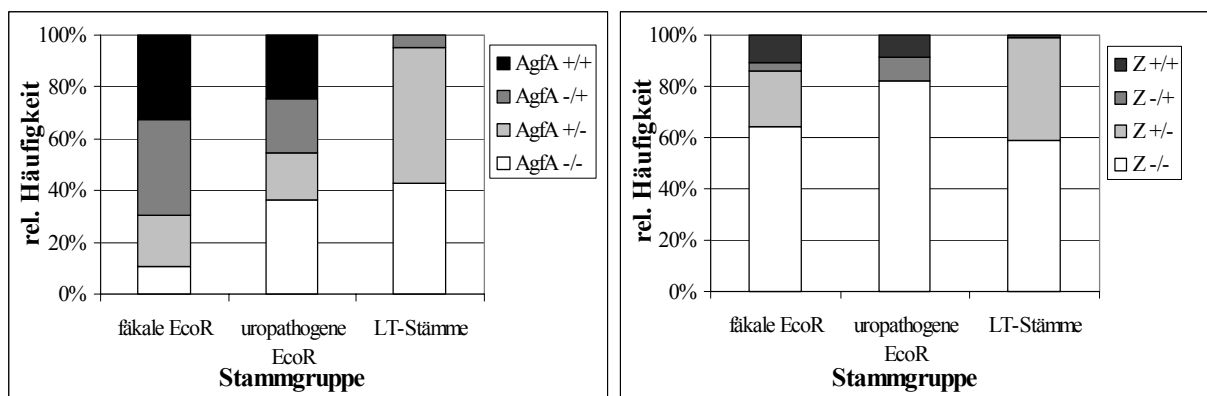


**Abb. 19:** Durchschnittliche Anzahl von Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm, gezeigt für kommensale und uropathogene EcoR-Stämme (*E. coli*) sowie für pathogene LT-Stämme (*Salmonella*)

Die Standardabweichungen verdeutlichen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der durchschnittlichen Anzahl an Gesamt-Phänotypen der drei Gruppen zu verzeichnen war.

### III.1.3.2.2. Prozentuale Anteile der AgfA- und der zelluloseproduzierenden Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) bei den Stämmen beider Sammlungen:

Analog zu den frischen Isolaten wurde der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grad der AgfA- bzw. Zelluloseexpression und der Pathogenität der jeweiligen Stammgruppe bestand. Die Phänotypeinteilung erfolgte nach denselben Kriterien wie in Kapitel III.1.3.1.3., wobei allerdings eine Stütze der Zuordnung zu den einzelnen Phänotypgruppen beruhend auf CR- und CF-Phänotyp durch molekulare Daten weitgehend fehlte.



**Abb. 20:** Relative Auftrittshäufigkeit der einzelnen AgfA- bzw. Zellulose-Phänotypgruppen (28° C/37° C) bei den kommensalen und uropathogenen EcoR- sowie die pathogenen LT-Stämme: Eine Erklärung der AgfA- bzw. Zellulose-Phänotypen befindet sich im Text (Kapitel III.1.3.1.3.). links: AgfA; rechts: Zellulose (Z)

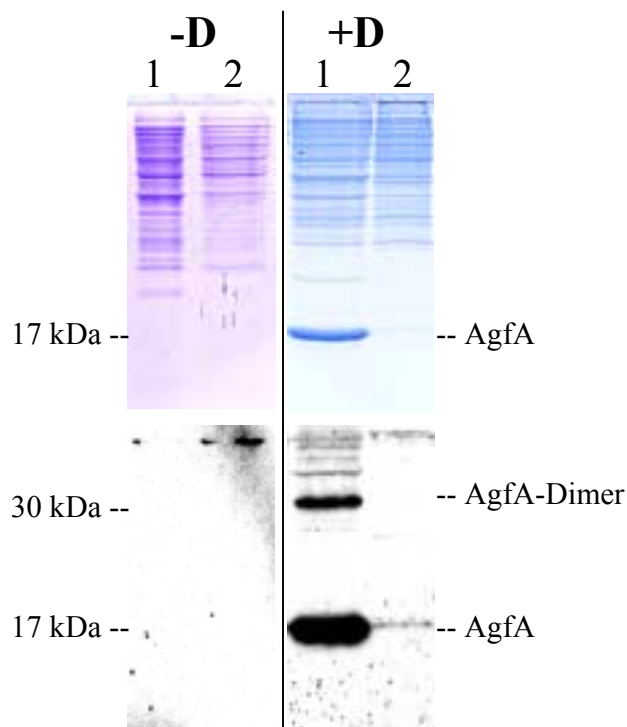
Anhand der Diagramme in Abb. 20 lässt sich eine gewisse Abhängigkeit vom Grad der AgfA-Expression und der Pathogenität der jeweiligen Stammgruppe erkennen. So exprimierten offensichtlich lediglich 5 % der *Salmonella*-Stämme bei 37° C AgfA. Bei den uropathogenen *E. coli*-Stämmen waren dies 45 % und bei den Fäkalisolaten etwa 70 %. Bei der Zelluloseproduktion waren die Verhältnisse nicht so eindeutig. Auffällig ist aber auch hier,

dass die LT-Stämme bei 37° C nahezu keine Zellulose exprimierten. Die Biofilmbildung war bei den LT-Stämmen im Vergleich zu den EcoR-Stämmen bei 37° C also insgesamt deutlich reduziert.

### III.1.4. Besonderheiten bezüglich der Bildung von AgfA und Zellulose:

#### III.1.4.1. Expression von AgfA und Zellulose unter Eisenmangelbedingungen:

2,2-Dipyridyl ist ein Chelator, der Eisenionen bindet und diese somit für die Bakterien unzugänglich macht. Sollten Eisenmangelbedingungen geschaffen werden, so wurden die entsprechenden Bakterienstämme auf 2,2-Dipyridyl-Agarplatten angezogen. 23 *Salmonella*-Stämme und ein probiotischer *E. coli*-Stamm wurden auf Veränderungen im Phänotyp sowie auf Veränderungen in der AgfA- und Zelluloseexpression unter Eisenmangel hin untersucht (s. Tab. 12). In mehreren Fällen waren Abweichungen von den unter üblichen Bedingungen erzielten Resultaten zu verzeichnen. Abb. 21 zeigt Beispiele für eine positive Auswirkung von Eisenmangel auf die Biofilmbildung anhand der AgfA-Detektion in Coomassie-Gel und Western Blot.



**Abb. 21:** Einfluss von Eisenmangel auf die AgfA-Expression gezeigt im Coomassie-Gel (oben) und auf einem Western Blot (unten): Die AgfA-Signale liegen bei 17 kDa. Das zusätzliche Signal bei 30 kDa stellt AgfA-Dimer dar. links: ohne 2,2-Dipyridyl (D); rechts: mit 2,2-Dipyridyl; 1: *S. Typhimurium* 00-03875/75; 2: *S. Typhimurium* 00-03875/76

Die gezeigten beiden Beispielfälle verdeutlichen, dass der Einfluss von Eisenmangel auf den Grad der AgfA-Expression von Stamm zu Stamm höchst unterschiedlich sein kann. Während im ersten Fall durch Eisenmangel eine sehr starke AgfA-Expression induziert wurde, lässt sich im zweiten Fall lediglich eine schwache AgfA-Bande erkennen. Die zweite stärkere Bande bei 30 kDa in der 00-03875/75-Probe stellt AgfA-Dimer dar.

**Tab. 12:** AgfA- und Zelluloseexpression unter Eisenmangelbedingungen bei ausgewählten *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*- und *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämmen sowie einem *E. coli*-Stamm: Für den Intensitätsgrad des AgfA-Signals bzw. der Glukosepeaks wurden dieselben Symbole bzw. Kriterien verwendet wie in Tab. 9. Alle Angaben bezüglich des Phänotyps und jeweiligen Intensitätsgrades beziehen sich auf 28° C/37° C. Spp.= Spezies; *S. E.* = *S. Enteritidis*; *S. T.* = *S. Typhimurium*; S.T.v.C. = *S. Typhimurium* var. Copenhagen; *E. c.* = *E. coli*; 2,2-D = 2,2-Dipyridyl; Ph. = Phänotyp; Z. = Zellulose; nd = nicht durchgeführt

Spp.	Stamm	Phänotyp	2,2-D-Ph.	2,2 D-AgfA	normal-AgfA	2,2-D-Z.	normal-Z.
<i>S. E.</i>	00-4156/45	rbdar+/ saw(bb)-	nd/ saw(bb)-	nd/-	+++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. E.</i>	00-4560/46	rbdar+/ saw(bb)-	nd/ saw(bb)-	nd/-	++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. E.</i>	00-4026/62	rdar+/ pdar+	nd/ pas-	nd/-	+++/(+)	nd/positiv	positiv/negativ
<i>S. E.</i>	00-4026/64	rbdar+/ saw(bb)-	nd/ saw(bb)-	nd/-	+++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-4037/65	rbdar+/ saw(bb)-	nd/ saw(db)-	nd/+	+++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-4037/66	saw(bb)-/ saw(bb)-	saw(bb)<+>/ saw(db)-	nd/-	-/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-4012/67	saw(bb)-/ saw(bb)-	saw(p)<+>/ saw(db)-	-/-	-/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-4013/68	rbdar(+)/ saw(bb)-	nd/ saw(db)-	nd/+	++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-4020/69	rbdar(+)/ saw(bb)-	nd/ saw(db)-	nd/++	++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-4020/70	saw(db)(+)/ saw(bb)-	bdar+/ saw(db)-	+++/+	++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-3876/71	rbdar(+)/ saw(bb)-	nd/ saw(bb)-	nd/(+)	+++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-3876/72	rdar(+)/ saw(bb)-	nd/ saw(db)-	nd/-	+/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-3874/73	rbdar(+)/ saw(bb)-	nd/ bas<(+)>	nd/++	+++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-3874/74	saw(bb)-/ saw(bb)-	saw(g)<(+)>/ saw(bb)<(+)>	nd/-	-/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-3875/75	rbdar(+)/ saw(bb)-	nd/ bas(+)	nd/+++	+++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-3875/76	saw(bb)-/ saw(bb)-	saw(bb)<+>/ saw(p)<(+)>	nd/(+)	-/-	nd/negativ	nd/nd
<i>S. T.</i>	00-7081/44	rbdar(+)/ saw(bb)-	nd/ saw(db)-	nd/+	++/-	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i> v.C.	00-08774	saw(bb)-/ saw(bb)-	saw(p)<+>/ nd	-/nd	-/nd	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i> v.C.	00-07478	saw(bb)-/ saw(bb)-	pas<+>/ nd	-/nd	-/nd	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i> v.C.	00-07087	saw(g)-/ saw(g)-	saw(g)-/ nd	-/nd	-/nd	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i> v.C.	00-06699	saw(bb)-/ saw(g)-	saw(p)++/ nd	-/nd	-/nd	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i> v.C.	00-06506	saw(bb)-/ saw(bb)-	bas-/ nd	-/nd	-/nd	nd/nd	nd/nd
<i>S. T.</i>	UMR1	rdar+/ saw(bb)-	nd/ saw(db)-	nd/++	nd/-	nd/positiv	nd/nd
<i>E. c.</i>	Nissle 1917	pdar+/ pas++	nd/ pdar(wr)++	nd/(+)	++/-	nd/positiv	nd/nd

Wie aus Tab. 12 ersichtlich lag eine serotypspezifische Antwort auf Eisenmangel vor. So zeigten die *S. Enteritidis*-Stämme überhaupt keine Reaktion. Bei den *S. Typhimurium*-



Stämmen sowie dem *E. coli*-Stamm bestand die Reaktion auf den Eisenmangel in der Regel darin, dass die AgfA Expression verstärkt bzw. AgfA auch bei 37° C exprimiert wurde, während die Zelluloseproduktion weitgehend unbeeinflusst blieb. Interessante Ausnahmen von dieser Regel waren die Stämme 00-4037/66, 00-4012/67 und 00-3876/72, bei denen trotz des dunkleren Phänotyps bei 37° C kein AgfA nachzuweisen war. Darüber hinaus zeigten die Stämme

00-4037/66, 00-4012/67 und 00-4020/70 bei 28° C eine nennenswert verstärkte Zelluloseproduktion, wodurch diese Stämme ebenfalls von der Regel abwichen.

Die *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme reagierten auf den Eisenmangel mit verstärkter Zelluloseproduktion, was anhand des veränderten CR-Phänotyps und des gesteigerten CF-Bindungsgrades zu sehen war, wohingehend die AgfA-Expression unverändert blieb. Ausnahmen diesbezüglich waren der Stamm 00-07087, der keine Reaktion auf den Eisenmangel zeigte, und der Stamm 00-06506, der unter Eisenmangelbedingungen einen dunkleren Phänotyp aufwies, bei dem aber kein AgfA detektiert werden konnte. Der zuletzt genannte Stamm zeigte auf CF + 2,2-Dipyridyl-Platten auch keine Fluoreszenz.

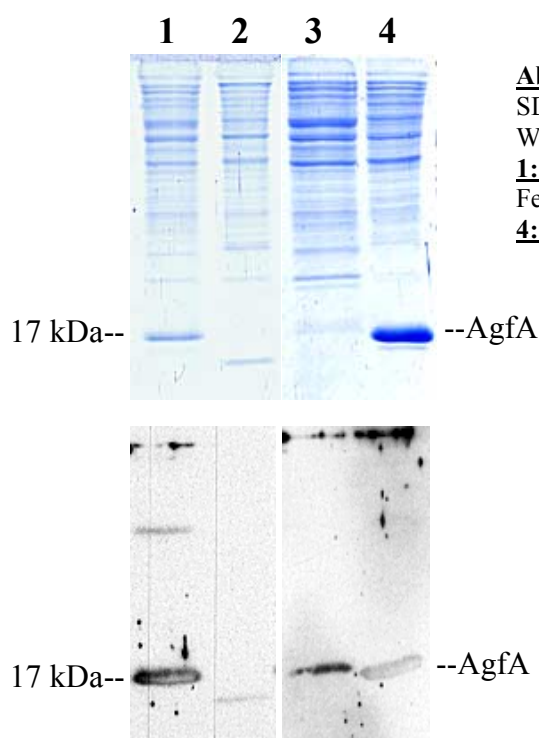
Die grundlegenden Änderungen in der Phänotypausprägung in Abhängigkeit vom Serotyp sind in Tab. 13 noch einmal zusammengestellt.

**Tab. 13:** Serotypspezifische Änderungen in der Phänotypausprägung unter Einfluss von 2,2-Dipyridyl bei *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen

Serotyp	Veränderung unter 2,2-Dipyridyleinfluss (28° C/37° C)
<i>S. Enteritidis</i>	nd/keine Veränderungen
<i>S. Typhimurium</i>	mehr AgfA/mehr AgfA
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	mehr Zellulose/nd

### III.1.4.2. AgfA-Varianten mit abnormem Laufverhalten:

Das AgfA zweier *E. coli*-Stämme zeigte im SDS-Gel ein abnormes Laufverhalten. Abb. 22 verdeutlicht dies.

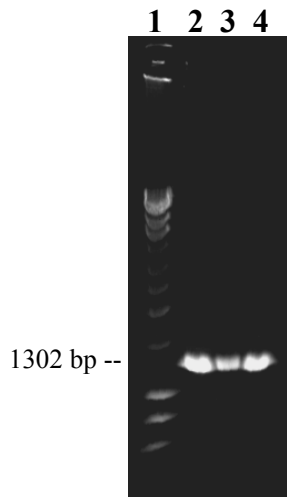


**Abb. 22:** AgfA-Varianten mit abnormem Laufverhalten im SDS-Gel gezeigt im Coomassie-Gel (oben) und auf einem Western Blot (unten):

**1:** *E. coli* Fec108 (normales AgfA bei 17 kDa); **2:** *E. coli* Fec110 (abnormes AgfA); **3:** *E. coli* Urp41 (abnormes AgfA); **4:** *S. Typhimurium* MAE 52 (normales AgfA bei 17 kDa)

Wie auf Abb. 22 gezeigt, schien das AgfA des *E. coli*-Stammes Fec110 eine deutlich geringere Molekülmasse aufzuweisen als normales AgfA. Der Stamm Urp41 hingegen schien ein geringfügig größeres AgfA zu exprimieren.

Um zu überprüfen, ob diese Massendifferenzen auf einer Insertion bzw. Deletion im *agfA*-Gen beruhen, wurde zunächst eine PCR mit den Primern AgfA60 und AgfA66 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 23 dargestellt.



**Abb. 23:** Durch PCR amplifiziertes *agfA*-Gen: **1:** Marker; **2:** Urp41; **3:** Fec110; **4:** Fec108 (Kontrolle)

Der Vergleich der PCR-Produkte der beiden Stämme Urp41 und Fec110 mit dem PCR-Produkt des Kontrollstammes Fec108 zeigte, dass keine nennenswerten Größenunterschiede zwischen den *agfA*-Genen der beiden Stämme zum normalen *agfA*-Gen bestanden.

Die *agfA*-Gene der beiden Stämme Urp41 und Fec110 wurden sequenziert und die so erhaltenen Sequenzen mit der entsprechenden Sequenz des *E. coli*-Stammes K12 verglichen (s. Abb. 24).

		1				50
<i>E. coli</i> K12,	<i>agfA</i>	ATGAAACTTT	TAAAAGTAGC	AGCAATTGCA	GCAATCGTAT	TCTCCGGTAG
<i>E. coli</i> Fec110,	<i>agfA</i>	ATGAAACTTT	TAAAAGTAGC	AGCAATTGCA	GCAATCGTAT	TCTCCGGTAG
<i>E. coli</i> Urp41,	<i>agfA</i>	ATGAAACTTT	TAAAAGTAGC	AGCAATTGCA	GCAATCGTAT	TCTCTGGTAG
<i>E. coli</i> K12,	AgfA	M~K~L~L	~K~V~A~	~A~I~A~	A~I~V~F	~S~G~S~
<i>E. coli</i> Fec110,	AgfA	M~K~L~L	~K~V~A~	~A~I~A~	A~I~V~F	~S~G~S~
<i>E. coli</i> Urp41,	AgfA	M~K~L~L	~K~V~A~	~A~I~A~	A~I~V~F	~S~G~S~
		51				100
<i>E. coli</i> K12,	<i>agfA</i>	CGCTCTGGCA	GGTGTGTGTC	CTCAGTACGG	CGGCGGCGGT	AACCACGGTG
<i>E. coli</i> Fec110,	<i>agfA</i>	CGCTCTGGCA	GGTGTGTGTC	CTCAGTACGG	CGGCGGCGGT	AACCACGGTG
<i>E. coli</i> Urp41,	<i>agfA</i>	CGCTCTGGCA	GGTGTGTGTC	CTCAGTACGG	CGGCGGCGGT	AACCACGGTG
<i>E. coli</i> K12,	AgfA	~A~L~A~	G~V~V~P	~Q~Y~G~	~G~G~G~	N~H~G~G~
<i>E. coli</i> Fec110,	AgfA	~A~L~A~	G~V~V~P	~Q~Y~G~	~G~G~G~	N~H~G~G~
<i>E. coli</i> Urp41,	AgfA	~A~L~A~	G~V~V~P	~Q~Y~G~	~G~G~G~	N~H~G~G~
		101				150
<i>E. coli</i> K12,	<i>agfA</i>	GTGGCGGTAA	TAATAGCGGC	CCAAATTCTG	AGCTGAACAT	TTACCAGTAC
<i>E. coli</i> Fec110,	<i>agfA</i>	GTGGCGGTAA	TAATAGCGGC	CCAAATTCAG	AGCTGAACAT	TTACCAGTAC
<i>E. coli</i> Urp41,	<i>agfA</i>	GTGGCGGTAA	TAATAGCGGC	CCAAATTCAG	AGCTGAACAT	TTACCAGTAC
<i>E. coli</i> K12,	AgfA	~G~G~N~	~N~S~G~	P~N~S~E	~L~N~I~	~Y~Q~Y~
<i>E. coli</i> Fec110,	AgfA	~G~G~N~	~N~S~G~	P~N~S~E	~L~N~I~	~Y~Q~Y~
<i>E. coli</i> Urp41,	AgfA	~G~G~N~	~N~S~G~	P~N~S~E	~L~N~I~	~Y~Q~Y~

**C5a**

		151		200	
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>agfA</i>	GGTGGCGGTA	ACTCTGCACT	TGCTCTGCAA	ACTGATGCCC	GTAACCTCTGA
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>agfA</i>	GGTGGCGGTA	ACTCTGCACT	TGCTCTGCAA	ACTGATGCCC	GTAACCTCTGA
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>agfA</i>	GGTGGCGGTA	ACTCTGCTCT	TGCTCTGCAA	<b>GCTGACGCCC</b>	GTAACCTCTGA
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>AgfA</i>	<b>G</b> ~G~G~N	~S~A~L~	~A~L~Q~	T~D~A~R	~N~S~D~
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>AgfA</i>	<b>G</b> ~G~G~N	~S~A~L~	~A~L~Q~	T~D~A~R	~N~S~D~
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>AgfA</i>	<b>G</b> ~G~G~N	~S~A~L~	~A~L~Q~	<b>A</b> ~D~A~R	~N~S~D~
		201		250	
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>agfA</i>	CTTGACTATT	ACCCAGCATG	GCGGCGGTAA	TGGTGCAGAT	GTTGGTCAGG
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>agfA</i>	CTTGACTATT	ACCCAGCATG	GCGG <b>T</b> GGTAA	TGGTGCAGAT	GT <b>A</b> GGTCAGG
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>agfA</i>	<b>TCT</b> GACCATT	ACCCAGCACG	GCGGCGGTAA	<b>CGGC</b> GCAGAT	GTTGG <b>CCAAG</b>
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>AgfA</i>	~L~T~I~	T~Q~H~G	~G~G~N~	~G~A~D~	V~G~Q~G
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>AgfA</i>	~L~T~I~	T~Q~H~G	~G~G~N~	~G~A~D~	V~G~Q~G
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>AgfA</i>	~L~T~I~	T~Q~H~G	~G~G~N~	~G~A~D~	V~G~Q~G
			<b>C5b</b>		
		251		300	
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>agfA</i>	GCTCAGATGA	CAGCTCAATC	GATCTGACCC	AACGTGGCTT	CGGTAACAGC
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>agfA</i>	GCTCAGATGA	CAGCTCAATC	GATCTGACCC	AACGTGGCTT	CGGTAACAGC
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>agfA</i>	<b>GTTCT</b> GATGA	CAGCTCAATC	GATCTGACT <b>C</b>	<b>AGCGTGGTTT</b>	CGG <b>CA</b> ACAGC
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>AgfA</i>	~S~D~D~	~S~S~I~	D~L~T~Q	~R~G~F~	~G~N~S~
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>AgfA</i>	~S~D~D~	~S~S~I~	D~L~T~Q	~R~G~F~	~G~N~S~
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>AgfA</i>	~S~D~D~	~S~S~I~	D~L~T~Q	~R~G~F~	~G~N~S~
				<b>C5c</b>	
		301		350	
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>agfA</i>	GCTACTCTTG	ATCAGTGGAA	CGGCAAAAAT	TCTGAAATGA	CGGTAAACAGC
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>agfA</i>	G <b>CC</b> ACTCTTG	ATCAGTGGAA	CGGCAAAAAT	TCTGAAATGA	CT <b>G</b> TAAACAGC
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>agfA</i>	GCTACTCTTG	ATCAGTGGAA	<b>TGGTAAAGAT</b>	TCT <b>ACT</b> ATGA	CTGTAAACAGC
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>AgfA</i>	<b>A</b> ~T~L~D	~Q~W~N~	~G~K~N~	S~E~M~T	~V~K~Q~
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>AgfA</i>	<b>A</b> ~T~L~D	~Q~W~N~	~G~K~N~	S~E~M~T	~V~K~Q~
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>AgfA</i>	<b>A</b> ~T~L~D	~Q~W~N~	~G~K~D~	S~ <b>T</b> ~M~T	~V~K~Q~
			<b>C5d</b>		
		351		400	
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>agfA</i>	GTTTCGGTGGT	GGCAACGGTG	CTGCAGTTGA	CCAGACTGCA	TCTAACTCCT
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>agfA</i>	GTTTCGGTGGT	GGCAACGGTG	CTGCAGTTGA	CCAGACTGCA	TCTAACTCCT
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>agfA</i>	GTTTCGGTGG <b>C</b>	GG <b>TA</b> ACGGTG	CTGCTGTTGA	CCAGACTGCA	TCTAACT <b>CCA</b>
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>AgfA</i>	~F~G~G~	G~N~G~A	~A~V~D~	~Q~T~A~	S~N~S~S
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>AgfA</i>	~F~G~G~	G~N~G~A	~A~V~D~	~Q~T~A~	S~N~S~S
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>AgfA</i>	~F~G~G~	G~N~G~A	~A~V~D~	~Q~T~A~	S~N~S~S
		401		450	
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>agfA</i>	CCGTCAACGT	GACTCAGGTT	GGCTTTGGTA	ACAACGCGAC	CGCTCATCAG
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>agfA</i>	CCGTCAACGT	GACTCAGGTT	GGCTTTGGTA	ACAACGCGAC	CGCTCATCAG
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>agfA</i>	<b>GCGT</b> <b>T</b> AACGT	<b>C</b> ACTCAGGTT	GGCTTTGGTA	ACAACGCGAC	CGCTCATCAG
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>AgfA</i>	~V~N~V~	~T~Q~V~	G~F~G~N	~N~A~T~	~A~H~Q~
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>AgfA</i>	~V~N~V~	~T~Q~V~	G~F~G~N	~N~A~T~	~A~H~Q~
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>AgfA</i>	~V~N~V~	~T~Q~V~	G~F~G~N	~N~A~T~	~A~H~Q~
			<b>C5e</b>		
		451			
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>agfA</i>	TACTAA				
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>agfA</i>	TACTAA				
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>agfA</i>	TACTAA				
<i>E. coli</i> <b>K12</b> , <i>AgfA</i>	<b>Y</b> ~*~				
<i>E. coli</i> <b>Fec110</b> , <i>AgfA</i>	<b>Y</b> ~*~				
<i>E. coli</i> <b>Urp41</b> , <i>AgfA</i>	<b>Y</b> ~*~				

**Abb. 24:** Sequenzvergleiche der *agfA*-Gene von *E. coli* K12, Fec110 und Urp41 sowohl auf DNS- als auch auf Proteinebene: Spezifische Proteindomänen (COLLINSON ET AL., 1999) sind farbig unterlegt, Mutationen sind in fett gedruckt. In rot gedruckte Buchstaben stellen sich in den einzelnen Domänen an gleicher Position

wiederholende Aminosäuren dar. Bei den schwarz gekennzeichneten Bereichen handelt es sich um konservierte Unpolar-polar-unpolar-Motive von Aminosäuren (COLLINSON ET AL., 1999).

Urp41 wies eine deutlich höhere Zahl von Punktmutationen gegenüber *E. coli* K12 auf als Fec110. Darüber hinaus waren alle Mutationen des Stammes Fec110 stille Mutationen, die sich nicht auf die Proteinsequenz auswirkten. Dies war auch bei der Mehrzahl der Punktmutationen in der Sequenz von Urp41 der Fall. Die wenigen Mutationen, die sich in der Proteinsequenz wiederfanden, liegen allesamt in Regionen außerhalb der zwischen den Domänen konservierten Bereiche.

Eine Leserasterverschiebung, welche möglicherweise die Etablierung eines neuen an einer anderen Stelle weiter stromauf bzw. stromab befindlichen Stoppcodons bewirkt hätte, konnte weder bei Fec110 noch bei Urp41 nachgewiesen werden. Ein an einer anderen Stelle gelegenes Stoppcodon hätte zur Folge gehabt, dass es während der Translation entweder zu einem vorzeitigen Kettenabbruch im Fall von Fec110 bzw. zu einer Verlängerung der Proteinkette im Fall von Urp41 gekommen wäre. Da aber die Etablierung eines neuen Stoppcodons im vorliegenden Fall ausgeschlossen werden konnte, muss das abnorme Laufverhalten des AgfA der beiden Stämme Fec110 und Urp41 auf anderen Ursachen beruhen.

### III.1.5. Zusammenhänge zwischen Phänotyp und anderen Parametern:

#### III.1.5.1. Phänotyp und Serotyp:

Der Serotyp eines gramnegativen Bakterienstammes setzt sich aus Oberflächen- (O-Antigene) und Geißelantigenen (H-Antigene) zusammen. Da in erster Linie die O-Antigene für die immunogenen Eigenschaften eines Bakterienstammes verantwortlich sind (VOET & VOET 1994), werden diese im Folgenden Hauptziel der Betrachtung sein und mit dem Begriff Serotyp gleichgesetzt werden.

##### III.1.5.1.1. Serotypen der Fäkalisolate und der uropathogenen *E. coli*-Stämme:

Von 107 Fäkalisolaten und 34 uropathogenen Bakterienstämmen wurde der Serotyp bestimmt. Die Fäkalisolate zeigten eine hohe Diversität, was die verschiedenen auftretenden Serotypen anbelangte. Folgende Serotypen konnten nachgewiesen werden: Ont, O1, O2, O6, O8, O9, O11, O15, O16, O17, O18, O39, O44, O63, O74, O75, O86, O99, O128, O130, O174 und O175. Ont als nicht näher bestimmbarer Serotyp war mit 36 % mit Abstand am häufigsten. Dieser Befund deckt sich mit den Befunden älterer Studien von kommensalen Fäkalisolaten, bei denen Ont mit 57 % ebenfalls der häufigste Serotyp war (BRAUNER ET AL., 1987).

Was die anderen Serotypen betrifft, so sind die Befunde weniger übereinstimmend. Zwar wurden die Serotypen O1, O2 und O75 sowohl bei der aktuellen (BOKRANZ, diese Arbeit) als auch bei der älteren Untersuchung (BRAUNER ET AL., 1987) beschrieben, jedoch war die Phänotypdiversität insgesamt bei den älteren Studien deutlich geringer als bei der aktuellen Untersuchung. Bei der aktuellen Untersuchung war die Diversität sehr hoch. Die einzelnen Serotypen traten jedoch nur mit Häufigkeiten zwischen 1 % und 8 % auf, während O1, O2 und O75 in der älteren Studie doch mit erheblichen Anteilen vertreten waren.

Bei den uropathogenen Stämmen wurden 8 Serotypen ermittelt, nämlich Ont, O2, O3, O6, O22, O25, O102 und Orauh. Orauh, der keine O-Antigene aufweist, war mit 38 % der häufigste Serotyp. O6 lag bei 26 % und O2 bei 11 %. Die anderen Serotypen lagen bei 3 % bis 6 %.

Bei einer vergleichbaren Untersuchung von uropathogenen Isolaten (ORSKOV 1978) war die Serotypdiversität deutlich höher. Die Serotypen O2, O6, O22 und O25 waren übereinstimmend mit den Ergebnissen der aktuellen Untersuchung auch bei dieser Untersuchung gefunden worden, die übrigen dort genannten Serotypen O1, O4, O7, O8, O9, O11, O62 und O75 traten bei der aktuellen Untersuchung hingegen nicht auf.

BRAUNER ET AL., 1987 erwähnen, dass bei ihren Studien die Serotypen O1, O4, O6, O7, O18 und O25 bei uropathogenen *E. coli*-Stämmen deutlich häufiger auftraten als bei kommensalen Fäkalisolaten. Dieser Befund stimmt ebenfalls nicht mit den aktuellen Daten (BOKRANZ, diese Arbeit) überein. In der Vergangenheit wurde aber bereits festgestellt, dass die Serotypen je nach der untersuchten Patientenpopulation variieren können (BRAUNER, persönliche Mitteilung).

### III.1.5.1.2. Korrelation zwischen Phänotyp und Serotyp bei *E. coli*-Stämmen derselben Probe:

Für diese Betrachtung wurde nicht zwischen Fäkalisolaten und uropathogenen Stämmen unterschieden. Bei 30 Versuchspersonen waren Isolate mit gleichem Phänotyp auf ihren Serotyp hin untersucht worden. Bei lediglich sieben Personen wiesen Stämme mit dem gleichen Phänotyp innerhalb einer Probe auch denselben Serotyp auf.

Bei den Proben von 18 Versuchspersonen gab es diesbezüglich immer mindestens eine Abweichung. Ein Beispiel hierfür liefert das Stammpaar Fec34 und Fec35. Obwohl beide Stämme bei beiden Temperaturen den Phänotyp saw(sw)- zeigen, gehören sie unterschiedlichen Serotypen an.

**Tab. 14:** Phänotypdiversität bei frischen *E. coli*-Isolaten mit gleichem Serotyp: nt = nicht typisierbar

Serotyp	Fäkalisolate	uropathogene Stämme
<b>Ont</b>	rdar+/rdar+ rdar+/rbdar+ rdar+/bas(+) rdar+/bas(wr)(+) rdar+/pdar+ rdar<(+)>/pdar+ rbdar+/rbdar+ rbdar+/bdar(+) rbdar(+)/bas(wr)- bdar-/bdar(wr)- bdar(+)/bas- bdar(+)/bas(wr)(+) bdar(+)/saw(db)- bdar-/saw(g)- saw(g)-/saw(g)- saw(bb)-/saw(bb)- saw(g)-/saw(bb)(+) saw(sw)-/saw(sw)-	rbdar(wr)(+)/saw(bb)<-> saw(p)+/pas+
<b>O2</b>	rbdar+/rbdar+ bdar(+)/bas(wr)(+)	rdar(+)/bas(wr)(+) rbdar+/pdar++
<b>O6</b>	bas-/saw(bb)- saw(g)-/saw(bb)-	rdar+/saw(bb)(+) rbdar(+)/rbdar+ rbdar+/saw(g)- rbdar(wr)(+)/saw(bb)<-> saw(bb)-/saw(g)<-> saw(g)-/saw(bb)-

Bei den Proben von fünf Personen verfügten Stämme mit gleichem Phänotyp über dieselben O-Antigene. Die H-Antigene waren in diesen Fällen jedoch zumindest bei einigen Stämmen

der jeweiligen Probe unterschiedlich. So zeigten beispielsweise alle vier Stämme, die aus einer Urinprobe von Patient 7696 isoliert worden waren, den Phänotyp bdar(+)/bdar(+)-. Von zweien dieser Stämme, Urp45 und Urp47, wurde der Serotyp bestimmt. Während Urp45 den Serotyp O3:H4 aufwies, gehörte Urp47 dem Serotyp O3:H17 an.

Insgesamt gesehen konnte somit keine direkte Korrelation zwischen Phänotyp und Serotyp bei aus derselben Stuhl- bzw. Urinprobe stammenden *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden.

### III.1.5.1.3. Gemeinsame Serotypen von kommensalen und uropathogenen *E. coli*-Stämmen:

Die Serotypen Ont, O2 und O6 waren sowohl bei den kommensalen als auch bei den uropathogenen *E. coli*-Stämmen der aktuellen Untersuchung vertreten. Bei Berücksichtigung der Untersuchung von ORSKOV 1978 kamen zusätzlich noch die Serotypen O1, O8, O9 und O11 hinzu, die bei beiden Stammgruppen nachgewiesen worden waren.

Eine interessante Frage war nun, ob frisch isolierte Stämme beider Stammgruppen, die einen der drei zuerst genannten Serotypen aufwiesen, auch den gleichen Phänotyp zeigten. Tab. 14 zeigt das Ergebnis der entsprechenden Gegenüberstellung.

Tab. 14 zeigt, dass die Phänotypdiversität bei Stämmen beider Gruppierungen mit gleichem Serotyp sehr hoch war. Somit scheinen Serotyp und Phänotyp gänzlich voneinander unabhängige Parameter zu sein.

### III.1.5.2. Phänotyp, Motilität und Prototrophie:

#### III.1.5.2.1. Zusammenhang zwischen Phänotyp und Prototrophie:

Alle *E. coli*-Stämme einschließlich der EcoR-Sammlung sowie nahezu alle *Salmonella*-Stämme einschließlich der LT-Sammlung wurden daraufhin untersucht, ob sie prototroph oder auxotroph waren.

Wie sich herausstellte, waren die frischen *E. coli*-Isolate allesamt prototroph. Von den 72 Stämmen der EcoR-Sammlung erwiesen sich sechs Stämme als auxotroph, nämlich EcoR49, EcoR52, EcoR59, EcoR61, EcoR62 und EcoR71. Darüber hinaus gab es bei den folgenden drei Stämmen auxotrophe Einzelklone: EcoR23 Klon B, EcoR29 Klon C und EcoR48 Klon A (s. Anhang VII.E). Bei den auxotrophen Stämmen bzw. Klonen waren sowohl kommensale als auch uropathogene *E. coli* vertreten. Alle übrigen EcoR-Stämme waren prototroph.

Die Stämme der LT-Sammlung erwiesen sich allesamt als prototroph. Das Gleiche galt für die zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme. Bei den *S. Typhimurium*-Stämmen aus Wernigerode konnten drei auxotrophe Stämme identifiziert werden, nämlich 00-04037/65, 00-03875/75 und 00-03942/43, der Rest war prototroph. Von den *S. Enteritidis*-Stämmen war lediglich der Stamm 97-00728/26 auxotroph. Bei den *S. Choleraesuis*-Stämmen traf dies auf den Stamm 86-00656 als einzigen zu. Anders verhielt es sich bei den *S. Typhi*-Stämmen. Von allen 19 Stämmen war lediglich der Stamm 00-03434 prototroph. Die restlichen Stämme waren alle auxotroph. Als auxotroph erwies sich auch der Laborstamm 318 von *S. Abortusovis*.

Insgesamt gesehen konnte kein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Prototrophie festgestellt werden. So zeigten die auxotrophen Stämme bei allen Spezies die verschiedensten Phänotypen. Allerdings scheint ein gewisser Zusammenhang zwischen Prototrophie und Serotyp zu bestehen. So waren so gut wie alle *S. Typhi*-Stämme auxotroph, was bei einem wirtsadaptierten Organismus auch zu erwarten war.

#### III.1.5.2.2. Zusammenhang zwischen Phänotyp und Motilität:

Die Motilität wurde bei allen Wernigeroder *S. Typhimurium*-, *S. Enteritidis*- und *S. Typhimurium* var. Copenhagen- sowie ausgewählten LT-, *S. Typhi*- und *S. Choleraesuis*-

Stämmen wie in Kapitel II.5.13. beschrieben bestimmt. Als Maß für den Grad der Motilität diene der Durchmesser der jeweiligen Ausbreitungskreise der entsprechenden Stämme. Für die Stärke der Motilität wurden die fünf Stufen -, (+), +, ++ und +++ vergeben, wobei - keine Motilität und +++ besonders starke Motilität bedeuteten. Abb. 25 verdeutlicht diese Stufen.



**Abb. 25:** Die fünf Motilitätsstufen: Von links nach rechts: -, (+), +, ++, +++

Tab. 15 zeigt eine Gegenüberstellung von Phänotyp und Motilität der entsprechenden Stämme.

**Tab. 15:** Gegenüberstellung von Serotyp, Phänotyp und Motilität bei ausgewählten *Salmonella*-Stämmen: Angaben über den Grad der Motilität beziehen sich auf die in Abb. 25 aufgeführten fünf Motilitätsstufen

Spezies	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	Motilität
<i>S. Typhi</i>	00-02714	saw(g)-/saw(g)(+)	(+)
<i>S. Typhi</i>	01-00176	saw(g)-/saw(g)(+)	(+)
<i>S. Typhi</i>	01-00051	saw(g)-/saw(g)(+)	(+)
<i>S. Typhi</i>	01-04943	saw(bb)-/saw(bb)(+)	(+)
<i>S. Typhi</i>	01-05989	saw(bb)-/saw(g)(+)	(+)
<i>S. Typhi</i>	01-07794	saw(db)-/saw(db)(+)	-
<i>S. Typhi</i>	01-07795	saw(g)-/saw(db)(+)	(+)
<i>S. Choleraesuis</i>	00-01048	saw(bb)-/saw(bb)(+)	++
<i>S. Choleraesuis</i>	98-04389	saw(bb)-/saw(bb)(+)	+
<i>S. Choleraesuis</i>	96-08742	saw(bb)-/saw(g)(+)	++
<i>S. Choleraesuis</i>	96-02404	saw(bb)(+)/saw(g)(+)	+++
<i>S. Choleraesuis</i>	89-00655	bas(wr)-/saw(g)(+)	-
<i>S. Choleraesuis</i>	86-00656	saw(p)(+)/saw(bb)(+)	-
<i>S. Choleraesuis</i>	63-00657	saw(g)(+)/saw(g)(+)	-
<i>S. Choleraesuis</i>	61-00658	saw(bb)(+)/saw(g)(+)	-
<i>S. Choleraesuis</i>	90-00659	saw(g)(+)/saw(g)(+)	-
<i>S. Choleraesuis</i>	96 CB	saw(db)-/saw(db)-	-
<i>S. Choleraesuis</i>	SL2824	saw(bb)-/saw(bb)-	-
<i>S. Abortusovis</i>	318	saw(g)-/saw(g)(+)	-
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-08774	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-07478	saw(bb)-/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-07087	saw(g)-/saw(g)-	++
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-06699	saw(bb)-/saw(g)-	+
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-06506	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-00672	saw(bb)-/saw(bb)-	+++
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-00951	saw(bb)-/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	00-06356	saw(bb)-/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	99-08950	saw(bb)-/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i> v. C.	99-01184	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Enteritidis</i>	00-04026/62	rdar+/pdar+	+
<i>S. Enteritidis</i>	00-04026/64	rbdar+/saw(bb)-	++
<i>S. Enteritidis</i>	00-04156/45	rbdar+/saw(bb)-	++
<i>S. Enteritidis</i>	00-04560/46	rbdar+/saw(bb)-	++
<i>S. Enteritidis</i>	97-00728/26	rdar+/rdar+	+
<i>S. Enteritidis</i>	97-00728/28	rbdar+/saw(bb)-	++
<i>S. Enteritidis</i>	00059/6	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Enteritidis</i>	00060/7	rdar+/rdar+	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-04037/65	rbdar+/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-04037/66	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-04012/67	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-04013/68	rbdar(+)/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	00-04020/69	rbdar(+)/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	00-04020/70	saw(db)(+)/saw(bb)-	++

<i>S. Typhimurium</i>	00-03876/71	rbdar(+)/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	00-03876/72	rdar(+)/saw(bb)-	-
<i>S. Typhimurium</i>	00-03874/73	rbdar(+)/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-03874/74	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-03875/75	rbdar(+)/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	00-03875/76	saw(bb)-/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-03924/43	rbdar(+)/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	00-07081/44	rbdar(+)/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	LT14A	saw(bb)-/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	LT14B	rdar+/pas-	++
<i>S. Typhimurium</i>	LT14C	rbdar++/saw(bb)-	(+)
<i>S. Typhimurium</i>	LT14D	bas+/saw(bb)-	+
<i>S. Typhimurium</i>	LT14E	bas++/saw(bb)-	-
<i>S. Typhimurium</i>	LT14F	rbdar+/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	LT21A	rdar+/pas+	+
<i>S. Typhimurium</i>	LT21B	rdar+/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	LT21C	pdar++/saw(bb)-	-
<i>S. Typhimurium</i>	LT21D	saw(db)-/saw(bb)-	-
<i>S. Typhimurium</i>	LT21E	bas-/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	LT21F	bas<->/saw(bb)-	++
<i>S. Typhimurium</i>	LT21G	rbdar+/saw(bb)-	++

Die Gegenüberstellung zeigt, dass kein direkter Zusammenhang zwischen Phänotyp und Motilität zu bestehen scheint. So zeigten nicht motile Stämme die verschiedensten Phänotypen. Das Gleiche galt für die motilen und hypermotilen Stämme. Interessant ist, dass alle *S. Typhi*-Stämme mehr oder weniger nicht motil waren. Dasselbe traf auf 7 von 11 *S. Choleraesuis*-Stämmen zu. Dagegen waren alle *S. Enteritidis*- und *S. Typhimurium* var. Copenhagen- sowie die deutliche Mehrzahl der *S. Typhimurium*-Stämme sehr motil. Dies kann als möglicher Hinweis auf den Grad der Abhängigkeit von einem Wirt gewertet werden.

### III.1.6. Die genetischen Grundlagen der Biofilmbildung bei verschiedenen *Salmonella*-Wildtypstämmen:

Mit dem *S. Typhimurium*-Stamm ATCC14028 sind die genetischen Grundlagen, die zur Ausbildung von dünnen aggregativen Fimbrien und Zellulose führen, bereits gut untersucht worden. Am Anfang der entsprechenden Kaskade steht AgfD als transkriptioneller Regulator (HAMMAR ET AL., 1995; RÖMLING ET AL., 2000), welcher das *agfBAC*-Operon sowie das *adrA*-Gen positiv reguliert (RÖMLING ET AL., 1998B). Das *agfD*-Gen ist zu 100 % abhängig von OmpR, einem positiven transkriptionellen Regulator eines Zwei-Komponenten-Systems (BATCHELOR & GOULIAN 2003; WALTHERS ET AL., 2003; YOSHIDA ET AL., 2002A UND B), sowie von  $\sigma^S$  (RÖMLING 1998A UND B). Die Gene *agfB*, *agfA* und möglicherweise auch *agfC* sind Strukturgene, welche für die Komponenten der dünnen aggregativen Fimbrien kodieren (COLLINSON ET AL., 1996; RÖMLING ET AL., 1998A). Das *adrA*-Gen hingegen kodiert für den Regulator AdrA, welcher direkt oder indirekt auf Proteinebene mit den Produkten des *bcsABZC*-Operons interagiert (ZOGAY ET AL., 2001). Die einzelnen Gene dieses Operons kodieren für die Enzyme, welche für die Zelluloseproduktion notwendig sind. Die Expression des *adrA*-Gens ist nicht nur zu 100 % abhängig von AgfD sondern auch zu 50 % von  $\sigma^S$ . Insgesamt ist die Zelluloseproduktion von  $\sigma^S$  abhängig (RÖMLING ET AL., 2000).

So kommt es zur Ausbildung beider Biofilmkomponenten. Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit diese Kaskade auch bei *Salmonella*-Wildtypstämmen wirksam ist.



### III.1.6.1. Korrelation von Phänotyp und *rpoS*-Funktionalität:

Wie bereits erwähnt, ist zumindest bei *S. Typhimurium*-ATCC14028 die Transkription des *agfD*-Gens zu 100 % und die des *adrA*-Gens zu etwa 50 %  $\sigma^S$ -abhängig. Eine Funktionsbeeinträchtigung des *rpoS*-Gens sollte sich - sofern die Regulationskaskade der entsprechenden Wildtypstämme mit der des Stammes ATCC14028 identisch ist - folglich negativ auf die Biofilmbildung insgesamt bzw. bei Unabhängigkeit des *agfD* von  $\sigma^S$  zumindest auf die Zelluloseexpression auswirken, was sich wiederum in der Ausprägung des Phänotyps widerspiegeln sollte. Um diese These zu überprüfen, wurde der Katalasetest wie in Kapitel II.5.12. beschrieben bei nahezu allen *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen durchgeführt und der Grad der Zersetzung von Wasserstoffperoxid mit dem CR-Phänotyp verglichen.

Interessanterweise traten bisweilen Unterschiede im Grad der Funktionsbeeinträchtigung des *rpoS* eines Stammes in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur auf. Somit werden im Folgenden die Funktionalitäten für beide Temperaturen separat aufgeführt. In Tab. 16 sind alle Stämme, die eine deutliche Funktionsbeeinträchtigung des *rpoS* zeigten, aufgeführt.

**Tab. 16:** Korrelation von *rpoS*-Funktionsbeeinträchtigung und Phänotyp bei *Salmonella* und *E. coli*: Alle Stämme, die bei mindestens einer der beiden Temperaturen eine Katalaseaktivität von – oder (+) zeigten, sind aufgeführt. Nicht miteinander übereinstimmende Befunde sind in fett gedruckt. K. = Katalase

Spezies	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	K.-Aktivität (28° C/37° C)
<i>S. Typhi</i>	01-04943	saw(bb)-/saw(bb)(+)	++/(+)
<i>S. Typhi</i>	01-07794	saw(db)-/saw(db)(+)	-/-
<i>S. Gallinarum</i>	Hardt-PT1	saw(bb)(+)/saw(bb)(+)	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	00-04037/66	saw(bb)-/saw(bb)-	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	00-03874/74	saw(bb)-/saw(bb)-	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	00-03875/76	saw(bb)-/saw(bb)-	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT4	saw(bb)-/saw(bb)-	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT5	saw(bb)-/saw(bb)-	(+)/(+)
<i>S. Typhimurium</i>	LT11	saw(bb)-/saw(bb)-	(+)/(+)
<i>S. Typhimurium</i>	LT20A	saw(g)-/saw(g)-	(+)/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT20B	saw(g)-/saw(bb)-	(+)/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT20C	saw(bb)-/ <b>saw(db)+</b>	(+)/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT20D	saw(bb)-/saw(bb)-	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT22A	rdar(+)/rdar(+)	(+)/(+)
<i>S. Typhimurium</i>	LT22B	saw(db)-/saw(bb)-	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT22C	saw(db)-/saw(db)-	-/-
<i>S. Typhimurium</i>	LT22D	saw(bb)-/saw(db)-	-/-
<i>E. coli</i>	Urp9	saw(bb)-/saw(g)<->	(+)/+
<i>E. coli</i>	Urp40	saw(bb)-/saw(db)-	(+)/(+)
<i>E. coli</i>	Urp69	rdar+/ <b>pdar++</b>	++/(+)
<i>E. coli</i>	Urp71	saw(sw)-/saw(sw)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	Urp73	saw(g)-/saw(bb)-	++/-
<i>E. coli</i>	Urp75	saw(g)-/saw(bb)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	Urp77	rbdar(+)/ <b>rbdar+</b>	++/(+)
<i>E. coli</i>	Urp81	saw(g)-/saw(g)-	-/-
<i>E. coli</i>	Urp89	bas(wr)-/bas(wr)(+)	++/(+)
<i>E. coli</i>	Urp91	saw(bb)(+)/ <b>saw(db)+</b>	++/(+)
<i>E. coli</i>	Fec41	rdar<(+)>/bas(+)	++/(+)
<i>E. coli</i>	Fec45	rdar<(+)>/bas(+)	++/(+)
<i>E. coli</i>	Fec110	bdar-/saw(g)-	++/-
<i>E. coli</i>	Fec145	saw(g)-/saw(bb)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	Fec160	saw(g)-/saw(bb)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR3	saw(bb)-/bas-	+/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR5	saw(bb)-/saw(db)-	(+)/++
<i>E. coli</i>	EcoR6	saw(bb)-/saw(g)-	(+)/++
<i>E. coli</i>	EcoR11	saw(bb)-/bas-	+/(+)

<i>E. coli</i>	EcoR12B	saw(db)-/saw(db)(+)	(+)/++
<i>E. coli</i>	EcoR15C	<b>pas+</b> /saw(bb)-	(+)/+
<i>E. coli</i>	EcoR17	<b>pas++/pas++</b>	-/-
<i>E. coli</i>	EcoR20	saw(db)-/ <b>pas++</b>	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR21B	saw(db)-/ <b>saw(db)+</b>	+/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR23	bdar(wr)-/saw(g)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR28B	saw(sw)-/saw(g)-	+/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR28C	bas-/saw(db)(+)	++/-
<i>E. coli</i>	EcoR29A	bdar(+)/saw(db)(+)	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR31B	rdar+/ <b>rdar+</b>	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR33B	saw(bb)-/saw(g)(+)	(+)/++
<i>E. coli</i>	EcoR34A	<b>saw(p)+/saw(g)&lt;-&gt;</b>	(+)/+
<i>E. coli</i>	EcoR34B	<b>pas+</b> /saw(db)(+)	(+)/-
<i>E. coli</i>	EcoR34C	pas+/saw(bb)<->	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR38A	saw(vdb)-/saw(db)-	+/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR39	saw(sw)-/saw(g)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR40	saw(sw)-/saw(g)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR41	saw(sw)-/saw(g)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR43	saw(bb)-/saw(g)<->	(+)/+
<i>E. coli</i>	EcoR46	saw(bb)-/saw(rbb)(+)	(+)/+
<i>E. coli</i>	EcoR51	saw(bb)-/saw(g)-	(+)/+
<i>E. coli</i>	EcoR56A	saw(db)-/saw(db)-	(+)/++
<i>E. coli</i>	EcoR56B	saw(g)-/saw(db)-	(+)/++
<i>E. coli</i>	EcoR57	saw(bb)(+)/saw(g)(+)	(+)/++
<i>E. coli</i>	EcoR60A	saw(g)-/saw(g)-	(+)/+
<i>E. coli</i>	EcoR60B	saw(db)-/saw(db)(+)	-/-
<i>E. coli</i>	EcoR64	saw(bb)-/saw(g)-	(+)/+
<i>E. coli</i>	EcoR67A	bdar(wr)(+)/saw(db)(+)	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR67B	rbdar(+)/saw(db)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR71	saw(g)-/saw(g)-	++/(+)
<i>E. coli</i>	EcoR72B	saw(db)-/saw(db)-	+/(+)

Die Ergebnisse der Tabelle zeigen, dass bei den Stämmen mit *rpoS*-Defekten deutlich die weißen Phänotypen überwogen. Bei den Stämmen, die bei mindestens einer Temperatur Biofilmbildung zeigten, dominierten eindeutig die braunen Phänotypen rbdar, bdar, bas und saw(db). In der Regel unterstützten die CF-Bindungsgrade diese Befunde. So betrug der Fluoreszenzgrad selten mehr als (+). Somit schien bei der Mehrzahl der *Salmonella*- und *E. coli*-Wildtypstämme mit defektem *rpoS*-Gen tatsächlich entweder die Biofilmbildung vollständig unterbunden oder zumindest die Zelluloseproduktion insgesamt abgeschwächt zu sein.

Natürlich gab es auch einige Stämme, die trotz eines *rpoS*-Defektes starke Zelluloseproduktion aufwiesen, z.B. den *E. coli*-Stamm EcoR17. In diesen Einzelfällen sind zwei verschiedene Szenarien denkbar. Zum einen kann die Zelluloseproduktion tatsächlich unabhängig von  $\sigma^S$  sein. Da die Transkription des *adrA* von  $\sigma^S$  abhängig ist und in einer  $\sigma^S$ -Mutante nur die Expression von *adrA* zur Zelluloseproduktion gebraucht wird (s. Kapitel III.2.2.5.), ist es möglich, dass das *adrA* in diesen Stämmen  $\sigma^S$  unabhängig exprimiert wird. Zum anderen muss hier in Betracht gezogen werden, dass der Katalasetest lediglich einen indirekten Nachweis der *rpoS*-Funktionalität darstellt. So kann es sein, dass die Katalaseproduktion trotz eines funktionellen *rpoS* defekt ist.

### III.1.6.2. Überprüfung der Funktionsweise der Biofilmbildungskaskade bei *Salmonella*-Wildtypstämmen auf genetischer Ebene:

Mittels Phagentransduktion wurden gezielt bestimmte Schlüsselgene, z.B. das *agfD*-Gen, ausgewählter *S. Enteritidis*- und *S. Typhimurium*-Stämme ausgeschaltet und die Veränderungen im CR-Phänotyp dokumentiert. Als Spenderstämmen für die Insertionen in die entsprechenden Gene dienten die *S. Typhimurium*-Stämme MAE 316a (MAE 51 *rpoS101::Km<sup>r</sup>*), JF2757 (*ompR43::MudJ*), MAE 28 (UMR 1  $\Delta$ *agfD101::Km<sup>r</sup>*), ADR 1a (MAE 52 *adrA101::MudJ*) und MAE 150 (MAE 52 *bcsA101::MudJ*). Die Resultate sind in Tab. 17 zusammengestellt.

Die Regulationskaskade der *S. Typhimurium*-Stämme erwies sich mit der des Stammes ATCC14028 als identisch. Mit Ausnahme des *bcsA*-Genes resultierte das Ausschalten aller anderen Schlüsselgene einschließlich des *rpoS*-Gens in einem weißen Phänotyp bei 28° C. Das Ausschalten von *bcsA* bewirkte hier erwartungsgemäß einen braunen Phänotyp. Die *S. Enteritidis*-Stämme 00-04026/64, 97-00728/26 und 97-00728/28 verhielten sich ebenfalls weitgehend erwartungsgemäß. Beim Vorliegen eines *rdar*- oder *rbdar*-Phänotyps beim Wildtyp resultierte das Ausschalten von *agfD* oder *ompR* - parallel zu *S. Typhimurium* ATCC14028 - in einem weißen, das Ausschalten *bcsA* und *adrA* in einem braunen Phänotyp. Wurde *rpoS* ausgeschaltet, so war der resultierende Phänotyp ebenfalls braun, was für eine Unabhängigkeit des *agfD* von  $\sigma^S$  in diesen Stämmen spricht.

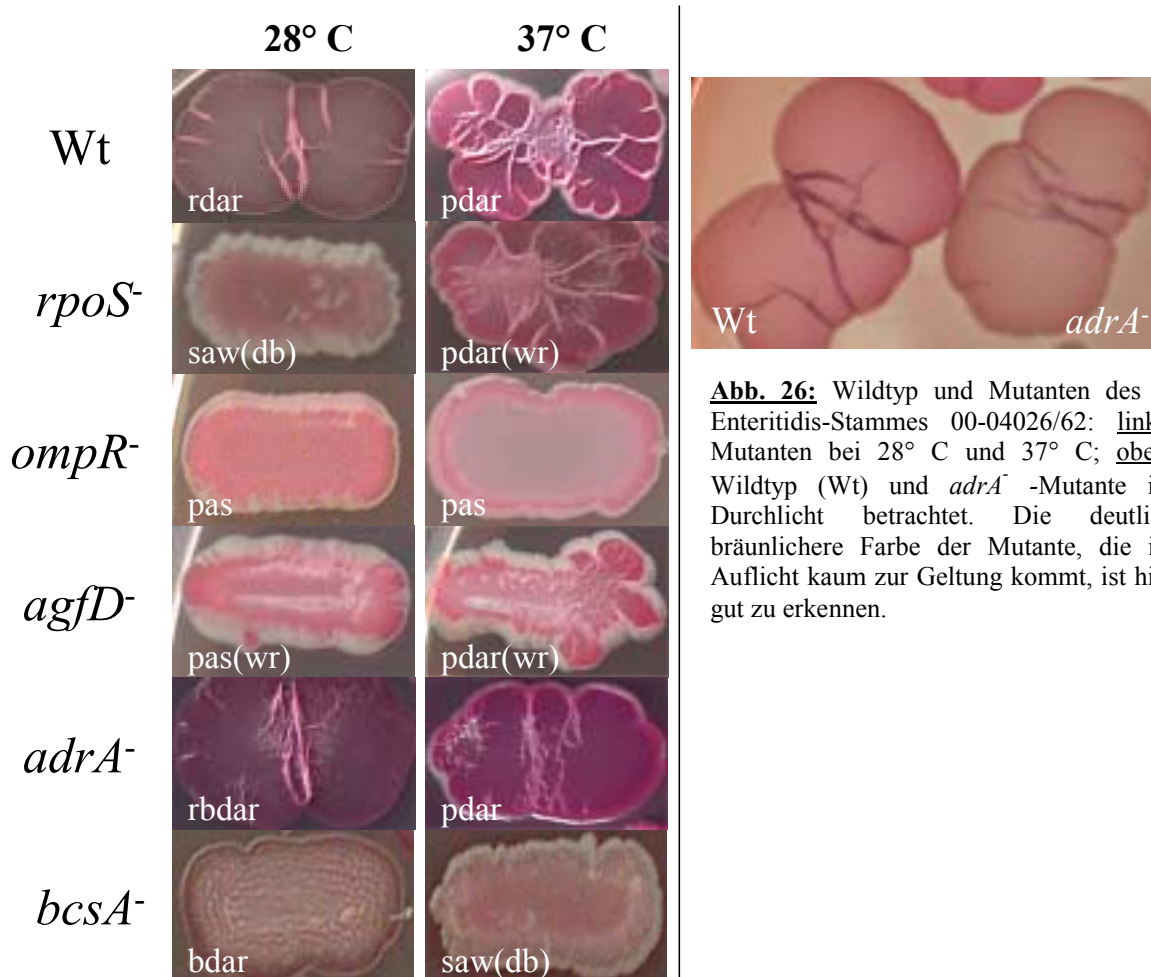
**Tab. 17:** Veränderungen im Phänotyp (28° C/37° C) bedingt durch gezieltes Ausschalten bestimmter Schlüsselgene bei *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*: Sp. = Spezies; Wt = Wildtyp; nd = nicht durchgeführt; S.E. = *S. Enteritidis*; S.Tm. = *S. Typhimurium*

Sp.	Stamm	Wt	<i>rpoS</i> <sup>-</sup>	<i>ompR</i> <sup>-</sup>	<i>agfD</i> <sup>-</sup>	<i>adrA</i> <sup>-</sup>	<i>bcsA</i> <sup>-</sup>
S.E.	00-04026/62	<i>rdar</i> +/ <i>pdar</i> +	<i>saw</i> (db)/ <i>pdar</i> (wr)	<i>pas</i> / <i>pas</i>	<i>pas</i> (wr)/ <i>pdar</i> (wr)	<i>rbdar</i> / <i>pdar</i>	<i>bdar</i> / <i>saw</i> (db)
S.E.	00-04026/64	<i>rbdar</i> +/ <i>saw</i> (bb)-	<i>bas</i> / <i>saw</i> (db)	<i>saw</i> (g)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (g)/ <i>saw</i> (bb)	<i>bdar</i> / <i>saw</i> (bb)	<i>bas</i> / <i>saw</i> (bb)
S.E.	97-00728/26	<i>rdar</i> +/ <i>rdar</i> +	<i>bdar</i> / <i>bdar</i>	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	nd/ nd	<i>bdar</i> / <i>saw</i> (bb)
S.E.	97-00728/28	<i>rbdar</i> +/ <i>saw</i> (bb)-	<i>bas</i> / <i>saw</i> (db)	nd/ nd	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	nd/ nd
S.Tm.	00-04037/65	<i>rbdar</i> +/ <i>saw</i> (bb)-	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	<i>bdar</i> / <i>saw</i> (bb)
S.Tm.	00-04013/68	<i>rbdar</i> (+)/ <i>saw</i> (bb)-	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	<i>bas</i> / <i>saw</i> (bb)
S.Tm.	00-04020/69	<i>rbdar</i> (+)/ <i>saw</i> (bb)-	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (g)/ <i>saw</i> (g)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	<i>bas</i> / <i>saw</i> (bb)
S.Tm.	00-03876/71	<i>rbdar</i> (+)/ <i>saw</i> (bb)-	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	<i>bdar</i> / <i>saw</i> (bb)
S.Tm.	00-03874/73	<i>rbdar</i> (+)/ <i>saw</i> (bb)-	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (g)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	<i>bas</i> / <i>saw</i> (bb)
S.Tm.	00-03874/74	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)-	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)	nd/ nd	nd/ nd	<i>saw</i> (bb)/ <i>saw</i> (bb)

Hier liegt also eine Abweichung der Regulationskaskade von der des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028 in diesen drei Stämmen vor. Der *S. Enteritidis*-Stamm 97-00728/26 verfügt - analog zu *S. Typhimurium* SR-11b (RÖMLING ET AL., 1998B) - offensichtlich zusätzlich über einen temperaturunabhängigen *agfD*-Promotor. So zeigt der Wildtyp dieses Stammes im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Wildtypstämmen parallel zu *S. Typhimurium* SR-11b auch bei 37° C den Phänotyp *rdar*. Interessante Abweichungen von der

Regel zeigte der *S. Enteritidis*-Stamm 00-04026/62. Dieser Stamm war ursprünglich zusammen mit dem Stamm 00-04026/64 aus derselben Quelle isoliert worden und stellt eine Mutante dieses Stammes dar (RÖMLING ET AL., 2003).

Wurde bei 00-04026/62 *rpoS* ausgeschaltet, so blieb der Phänotyp zumindest bei 37° C nahezu unbeeinflusst. Da *adrA* bei *S. Typhimurium* ATCC14028 zu etwa 50 %  $\sigma^S$ -abhängig ist und wäre hier eine deutliche Reduktion der Zelluloseexpression zu erwarten gewesen. Die Reduktion des Phänotyps *rdar* zu *saw(db)* bei 28° C war ein Hinweis darauf, dass - analog zu den übrigen *S. Enteritidis*-Stämmen - eine gewisse Unabhängigkeit des *agfD* von  $\sigma^S$  bestand.



Das Ausschalten von *agfD* oder *ompR* schlug sich bei diesem Stamm in der Ausprägung eines pinken anstelle eines weißen Phänotyps nieder. Da – zumindest bei *S. Typhimurium* ATCC14028 - *adrA* und *agfBAC* zu 100 % von AgfD abhängig sind und *agfD* wiederum zu 100 % von OmpR, wäre hier eigentlich die Ausbildung eines weißen Phänotyps zu erwarten gewesen.

Durch das Ausschalten des *adrA*-Gens wurde bei 28° C nur eine leichte Abschwächung der Zelluloseexpression erzielt was anhand des Phänotypwechsels von *rdar* zu *rbdar* zu sehen war. Bei 37° C war kaum ein Unterschied im Phänotyp auszumachen. Erst das Ausschalten von *bcsA* bewirkte die erwartete vollständige Reduktion der Zellulosebildung.

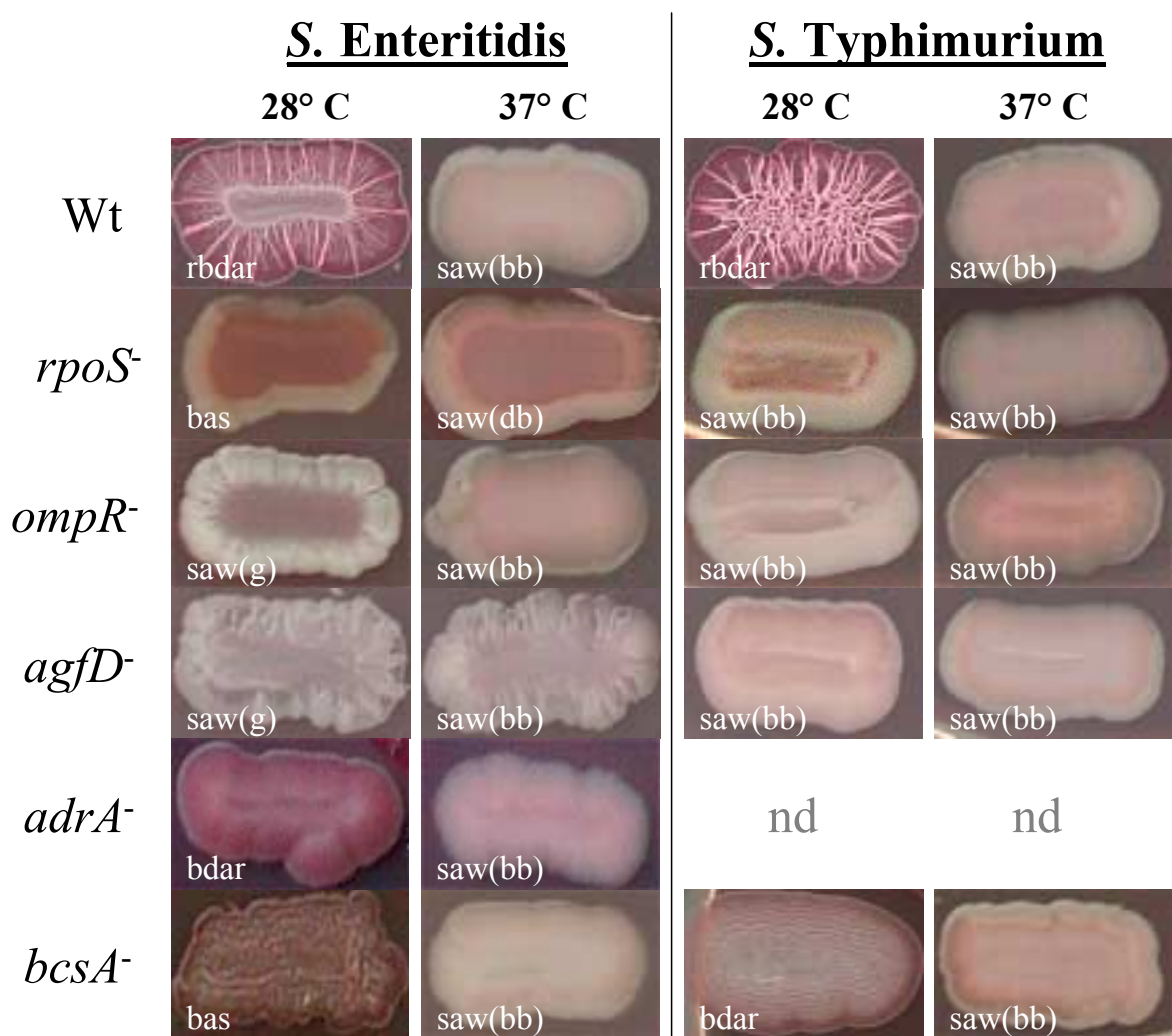
Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgern, dass die Zellulosebiosynthese beim *S. Enteritidis*-Stamm 00-04026/62 unabhängig von der Wechselwirkung mit AdrA ist.

Die Abbildungen 26 und 27 verdeutlichen noch einmal die Phagentransduktionsergebnisse anhand einzelner ausgesuchter Stämme.

### III.1.6.3. Untersuchung des bivalenten *agfDEFG-agfBAC*-Operons bei ausgewählten *Salmonella*-Wildtypstämmen:

#### III.1.6.3.1. Test auf das Vorhandensein von Insertionen bzw. Deletionen im bivalenten Operon:

Die hohe Phänotypdiversität muss sich auf genomischer Ebene in Mutationen widerspiegeln. So könnte die Ausprägung eines weißen Phänotyps bei beiden Temperaturen darin begründet liegen, dass das *agfD*-Gen, der Hauptregulator des multizellulären Morphotyps, nicht mehr exprimiert bzw. nicht mehr funktionell ist. Bei Shigellen geschieht das häufig durch eine Insertion oder Deletion im *agfDEFG-agfBAC*-Operon (SAKELLARIS ET AL., 2000). Deshalb wurde mittels PCR bei *Salmonella*-Stämmen mit weißem Phänotyp überprüft, ob Abnormitäten bezüglich der Größe des bivalenten Operons bestanden.

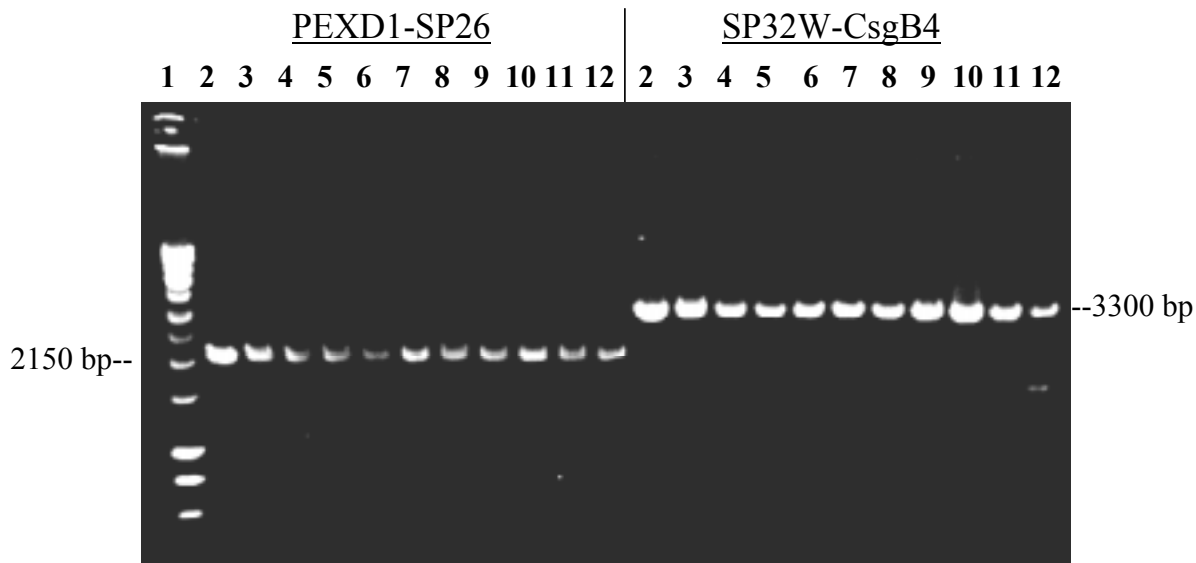


**Abb. 27:** Wildtyp und Mutanten des *S. Enteritidis*-Stammes 00-04026/64 und des *S. Typhimurium*-Stammes 00-04037/65: Wt = Wildtyp; nd = nicht durchgeführt

Einer entsprechenden Überprüfung wurden die *S. Typhi*-Stämme 00-02714, 01-00176, 01-00051, 01-04943, 01-05989, 01-07794 und 01-07795, die *S. Choleraesuis*-Stämme 00-01048, 98-04389, 96-08742, 96-02404, 89-00655, 86-00656, 63-00657, 61-00658 und 90-00659, der *S. Abortusovis*-Stamm 318, alle zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme und der *S. Typhimurium*-Stamm 00-04012/67 unterzogen.

Der gleiche Test wurde auch bei den *S. Enteritidis*-Stämmen 00-04156/45 und 00-04560/46 und den *S. Typhimurium*-Stämmen 00-04013/68, 00-03874/73 und 00-03875/75 durchgeführt. Diese Stämme zeigten bei 28° C den Phänotyp rbdar.

Darüber hinaus wurden auch die *S. Enteritidis*-Stämme 00-04026/62, 00-04026/64, 97-00728/26 und 97-00728/28 sowie die *S. Typhimurium*-Stämme 00-04037/65, 00-04037/66, 00-04020/69, 00-04020/70, 00-03876/71, 00-03876/72, 00-03924/43 und 00-07081/44 diesbezüglich untersucht. Diese Stämme zeichneten sich dadurch aus, dass jeweils die beiden Stämme mit gleicher Nummer zwar ursprünglich aus derselben Quelle stammten, sich aber später als phänotypisch heterogen herausstellten und somit ein Stammpaar bildeten (RÖMLING ET AL., 2003).



**Abb. 28:** PCR-Produkte über das komplette bivalente *agfDEFG-agfBAC*-Operon der zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme: 1: Marker; 2: *S. Typhimurium* MAE 52 (Kontrolle); 3: 00-08774; 4: 00-07478; 5: 00-07087; 6: 00-06699; 7: 00-06506; 8: 00-00672; 9: 00-00951; 10: 00-06356; 11: 99-08950; 12: 99-01184

Da die gesamte Region mit annähernd 5000 bp recht groß war, wurden für jeden Stamm zwei PCRs durchgeführt, welche - bei normaler Regiongröße - zwei kleinere sich leicht überlappende Teilprodukte ergaben. Für die meisten der oben aufgeführten Stämme fanden die Primerpaare SP32W mit CsgB4 sowie PEXD1 mit SP26 Anwendung (s. Kapitel II.8.1.5.2.). Die entsprechenden Teilprodukte waren 3300 bp bzw. 2150 bp groß. Für die *S. Enteritidis*-Stämme 00-04156/45 und 00-04560/46 und die *S. Typhimurium*-Stämme 00-03924/43 und 00-07081/44 wurden die Primerpaare CsgG mit CsgB1 und SP24 mit SP26 verwendet. Die hieraus resultierenden Teilprodukte waren 1520 bp bzw. 2550 bp groß. Da der Primer CsgG innerhalb des *agfG*-Gens lag und somit das CsgG-CsgB1-Teilprodukt verkürzt war, wurde jedoch die gesamte Region durch diese beiden Teilprodukte nicht vollständig abgedeckt. Somit blieb bei den entsprechenden vier Stämmen ein gewisser Unsicherheitsfaktor.

Wie sich zeigte, hatten alle Teilprodukte die zu erwartende Größe. Also konnte bei keinem Stamm das Vorhandensein einer größeren Insertion bzw. Deletion in der Region nachgewiesen werden. Abb. 28 zeigt das Ergebnis der einzelnen PCR-Reaktionen am Beispiel der zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme.



### III.1.6.3.2. Sequenzvergleiche des *agfD*-Gens sowie der intergenischen Region zwischen *agfD* und *agfBAC*-Operon bei ausgewählten *Salmonella*-Stämmen:

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen CR-Phänotypen bei den einzelnen Stämmen in einem veränderten *agfD*-Gen bzw. in einem veränderten Promotorbereich desselben begründet lagen, wurde das *agfD*-Gen und die zwischen dem *agfD*-Gen und dem *agfBAC*-Operon gelegene 521 bp große intergenische Region der zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme, der *S. Enteritidis*-Stämme 00-04026/62, 00-04026/64, 97-00728/26 und 97-00728/28 sowie der *S. Typhimurium*-Stämme 00-04037/65, 00-04037/66, 00-04020/69, 00-04020/70, 00-03876/71, 00-03876/72, 00-03874/73, 00-03874/74, 00-03875/75 und 00-03875/76 sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend mit der entsprechenden Sequenz des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1 bzw. mit den Sequenzen des *S. Typhi*-Stammes CT 18, des *S. Typhimurium*-Stammes LT 2 sowie einem Teilstück der entsprechenden Sequenz des *S. Enteritidis*-Stammes PT 4 verglichen. Die Sequenzen der drei zuletzt genannten Stämme wurden von der Internetseite des Sanger Centers UK bezogen. Der Stamm PT 4 war zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht vollständig durchsequenziert worden. Somit stand für den Sequenzvergleich lediglich ein die intergenische Region nicht vollständig abdeckendes Teilstück der PT 4-Sequenz zur Verfügung.

Wie sich zeigte, waren nahezu alle *S. Typhimurium*-Sequenzen einschließlich der des Stammes LT 2 mit der des Stammes UMR 1 identisch. Lediglich die beiden *S. Typhimurium*-Stämme 00-03876/71 und 00-03876/72 wiesen an Position -91 eine einzelne Punktmutation im Promotorbereich des *agfD*-Gens auf. Bei beiden Stämmen lag hier gegenüber der Sequenz des Stammes UMR 1 ein Basenaustausch von Cytosin nach Adenin vor. Die Abb. 29 verdeutlicht noch einmal die Ergebnisse für die *S. Typhimurium*-Wildtypstämme.

	Konsensus	-91	ACNTTT	NGNTACANNT	AT	OmpR D1
S.Tm.	UMR 1	AAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATATAT	TTTTACATTT	GGTTACAAGT
S.Tm.	00-03876/71	AAAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATATAT	TTTTACATTT	GGTTACAAGT
S.Tm.	00-03876/72	AAAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATATAT	TTTTACATTT	GGTTACAAGT
				OmpR D2		CpxR
</						

**Abb. 29:** *agfD*-Promotorregion dreier *S. Typhimurium*-Stämme: Mutationen gegenüber der entsprechenden UMR 1-Sequenz sind in fett gedruckt. Die beiden OmpR-Bindungsstellen D1 und D2, -35-Region, -10-Region und Transkriptionsstart sind farbig unterlegt. Die CpxR-Bindungsstelle ist eingekästelt. Die OmpR-Konsensussequenz befindet sich über den Sequenzen. Rot markierte Basen stellen Abweichungen von der OmpR-Konsensus-Bindungsstellensequenz dar. N = Nukleotid; S.Tm. = *S. Typhimurium*

Da die Punktmutation in der Sequenz beider *S. Typhimurium*-Wildtypstämme auftrat, konnte sie nicht für den Unterschied in der Phänotypausprägung bei diesen beiden Stämmen verantwortlich sein.

Die zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme ließen sich anhand ihrer Sequenzen in zwei Familien einteilen. So wiesen fünf der Stämme dieselbe stille Punktmutation gegenüber dem Stamm UMR 1 im *agfE*-Gen auf. Die restlichen fünf Stämme hatten eine Punktmutation in der -35-Region des *agfD*-Promotors an Position -33. Die Konsensussequenz für die -35-Region bei *Salmonella* und *E. coli* lautet TTGACA, wobei das G an dritter Stelle am höchsten konserviert ist (HARLEY & REYNOLDS 1987; HAWLEY & MC CLURE 1983; WALKER ET AL., 1998). Beim Stamm UMR 1 weichen die letzten drei Basen der -35-Region des *agfD*-

Promotors von dieser Konsensussequenz ab. Die noch stärkere Abweichung von der Konsensussequenz in den *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämmen könnte somit die Ursache dafür sein, dass die Biofilmbildung auf Agarplatten bei diesen Stämmen unterbunden war. Der Promotor sollte dann von keinem Sigmafaktor mehr erkannt und das *agfD*-Gen somit nicht mehr transkribiert werden. Diese Annahme wird durch die Befunde von WALKER ET AL., 1998 gestärkt, welche den *fis*-Promotor bei *E. coli* untersuchten. Die Sequenz der -35-Region dieses Promotors war TTTCAT. Wurde das T an dritter Stelle durch ein G ersetzt, so hatte dies eine bis zu 18fache Transkriptionssteigerung zur Folge.

Der Stamm 00-07087 zeigte zusätzlich zu dieser Mutation noch einen Basenaustausch im *agfD*-Promotorbereich an Position -57, welcher eine Änderung der Konsensus-Bindungssequenz von OmpR zur Folge hatte. In Abb. 30 sind die Ergebnisse noch einmal zusammengefasst.

Konsensus		ACN	NGNTACANNT	AT	-57	OmpR	D1
<i>S. Tm.</i>	<b>UMR 1</b>	AAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATAT	TTTACATTT	GGTTAC	AAGT
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-08774</b>	AAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATAT	TTTACATTT	GGTTAC	AAGT
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-07478</b>	AAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATAT	TTTACATTT	GGTTAC	AAGT
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-07087</b>	AAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATAT	TTTATTT	GGTTAC	AAGT
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-06699</b>	AAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATAT	TTTACATTT	GGTTAC	AAGT
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-06506</b>	AAAACCCAAA	AACAACATTT	TAAATATAT	TTTACATTT	GGTTAC	AAGT
		<b>OmpR D2</b>			<b>CpxR</b>		
		<b>-35</b>		<b>-10</b>		<b>+1</b>	
<i>S. Tm.</i>	<b>UMR 1</b>	TTAACACTTG	CTTTAAGATT	TGTAATGGCT	AGATTGAAAA	CAGTTAAAAAG	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-08774</b>	TTAACACTTT	CTTTAAGATT	TGTAATGGCT	AGATTGAAAA	CAGTTAAAAAG	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-07478</b>	TTAACACTTT	CTTTAAGATT	TGTAATGGCT	AGATTGAAAA	CAGTTAAAAAG	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-07087</b>	TTAACACTTT	CTTTAAGATT	TGTAATGGCT	AGATTGAAAA	CAGTTAAAAAG	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-06699</b>	TTAACACTTT	CTTTAAGATT	TGTAATGGCT	AGATTGAAAA	CAGTTAAAAAG	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-06506</b>	TTAACACTTT	CTTTAAGATT	TGTAATGGCT	AGATTGAAAA	CAGTTAAAAAG	
		<b>agfD-Ende</b>			<b>agfE-Start</b>		
<i>S. Tm.</i>	<b>UMR 1</b>	ATAATCTCAG	GCGGTAAGGC	CATGAAACGC	TATCTGACCT	GGATTGTAGC	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-00672</b>	ATAATCTCAG	GCGGTAAGGC	CATGAAACGA	TATCTGACCT	GGATTGTAGC	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-00951</b>	ATAATCTCAG	GCGGTAAGGC	CATGAAACGA	TATCTGACCT	GGATTGTAGC	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>00-06356</b>	ATAATCTCAG	GCGGTAAGGC	CATGAAACGA	TATCTGACCT	GGATTGTAGC	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>99-08950</b>	ATAATCTCAG	GCGGTAAGGC	CATGAAACGA	TATCTGACCT	GGATTGTAGC	
<i>S. T.v.C.</i>	<b>99-01184</b>	ATAATCTCAG	GCGGTAAGGC	CATGAAACGA	TATCTGACCT	GGATTGTAGC	

**Abb. 30:** Die beiden *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Sequenzfamilien; oben: *agfD*-Promotor-Sequenz; unten: *agfE*-Startbereich; Mutationen gegenüber der entsprechenden UMR 1-Sequenz sind in fett gedruckt. Die beiden OmpR-Bindungsstellen D1 und D2, -35-Region, -10-Region und Transkriptionsstart sind farbig unterlegt, ebenso *agfD*-Ende und *agfE*-Translationsstart. Start- bzw. Stoppcodons sind unterstrichen. Die CpxR-Bindungsstelle ist eingekästelt. Die OmpR-Konsensussequenz befindet sich über den Sequenzen. Rot markierte Basen stellen Abweichungen von der OmpR-Konsensus-Bindungsstellensequenz dar. N = Nukleotid; S.Tm. = *S. Typhimurium*; S.T.v.C. = *S. Typhimurium* var. Copenhagen

Die Familienzugehörigkeit der einzelnen Stämme konnte nicht direkt mit einem bestimmten Isolierungsort in Verbindung gebracht werden, was Tab. 18 zeigt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass neun aller zehn Taubenisolate aus der Bundesrepublik Deutschland wobei acht dieser Stämme aus den östlichen deutschen Bundesländern stammten. Das Einzugsgebiet war somit begrenzt.

Die *S. Enteritidis*-Stämme zeigten im *agfD* und der intergenischen Region insgesamt 13 Basenaustausche gegenüber dem *S. Typhimurium*-Stamm UMR 1, die bei allen Stämmen gleich waren. Zwei dieser Punktmutationen lagen innerhalb des *agfD*-Gens und waren stille Mutationen. Die restlichen elf Mutationen lagen in der intergenischen Region und schienen spezifisch für *S. Enteritidis* zu sein, da auch der vollständig sequenzierte *S. Enteritidis*-Stamm



PT 4 dieselben Basenaustausche aufwies. Die beiden Stämme PT 4 und 97-00728/26 hatten eine zusätzliche Punktmutation an Position –44 im *agfD*-Promotorbereich. Alle übrigen Stämme zeigten interessanterweise an dieser Stelle die *S. Typhimurium*-Sequenz.

**Tab. 18:** Herkunftsorte der zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme

Spezies	Stamm	Isolierungsort
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-08774	Dresden, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-07478	Bad Langensalza, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-07087	Frankfurt/Oder, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-06699	Kiel, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-06506	Potsdam, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-00672	Bad Langensalza, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-00951	Potsdam, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-06356	Bad Langensalza, Bundesrepublik Deutschland
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	99-08950	Dubai, Vereinigte Arabische Emirate
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	99-01184	Stendal, Bundesrepublik Deutschland

Der *S. Typhi*-Stamm CT 18 wies Merkmale von *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* auf. In der intergenischen Region stimmte die Sequenz überwiegend mit der des Stammes UMR 1 überein. Lediglich an Position –212 bezogen auf den *agfBAC*-Transkriptionsstart bzw. den Positionen –54 und –52 innerhalb des *agfDEFG*-Promotors zeigte die Sequenz Basenaustausche, die mit der *S. Enteritidis*-Sequenz konform waren. Zusätzlich wies die *S. Typhi*-Sequenz eine Baseninsertion an Position –145 bezogen auf den *agfBAC*-Transkriptionsstart auf. Innerhalb des *agfD* zeigte die *S. Typhi*-Sequenz neben den beiden stillen Mutationen der *S. Enteritidis*-Stämme zusätzliche vier Basenaustausche, von denen die ersten drei ebenfalls keine Auswirkung auf die Proteinsequenz hatten. Die Mutation an Position 627 hingegen führte zu einem verfrühten Abbruch der Translation auf Grund eines vorgezogenen Stoppcodons (PARKHILL ET AL., 2001). Möglicherweise war das verkürzte AgfD nicht mehr funktionsfähig, was die allesamt weißen Phänotypen der untersuchten *S. Typhi*-Wildtypstämme erklären könnte. Es sei jedoch angemerkt, dass keiner der in dieser Arbeit untersuchten

*S. Typhi*-Wildtypstämme sequenziert wurde. Die Befunde sind in Abb. 31 gezeigt.

		Start <i>agfB</i>					
S.T.	CT 18	TTCATGCTGT	CACCCTGGAC	CTGGTCGTAC	ATAGCGAAAA	TTATCTATTA	
S.Tm.	UMR 1	TTCATGCTGT	CACCCTGGAC	CTGGTCGTAC	ATAGCGAAAA	TTATCTATTA	
S.E.	PT 4	TTCATGCTGT	CACCCTGGAC	CTGGTCGTAC	ATAGCGAAAA	TTATCTATTA	
S.E.	00-04026/62	TTCATGCTGT	CACCCTGGAC	CTGGTCGTAC	ATAGCGAAAA	TTATCTATTA	
S.E.	00-04026/64	TTCATGCTGT	CACCCTGGAC	CTGGTCGTAC	ATAGCGAAAA	TTATCTATTA	
S.E.	97-00728/26	TTCATGCTGT	CACCCTGGAC	CTGGTCGTAC	ATAGCGAAAA	TTATCTATTA	
S.E.	97-00728/28	TTCATGCTGT	CACCCTGGAC	CTGGTCGTAC	ATAGCGAAAA	TTATCTATTA	
S.T.	CT 18	CCTTGTTAGC	GACATGCGTT	TTTTGT	TAAC	GCGTCG	TTAC
S.Tm.	UMR 1	CCTTGTTAGC	GACATGCGTT	TTTTGT	TAAC	GCGTCG	TTAC
S.E.	PT 4	CCTTGTTAGC	GACATGCGTT	TTTTGT	TAAC	GCGTCG	TTAC
S.E.	00-04026/62	CCTTGTTAGC	GACATGCGTT	TTTTGT	TAAC	GCGTCG	TTAC
S.E.	00-04026/64	CCTTGTTAGC	GACATGCGTT	TTTTGT	TAAC	GCGTCG	TTAC
S.E.	97-00728/26	CCTTGTTAGC	GACATGCGTT	TTTTGT	TAAC	GCGTCG	TTAC
S.E.	97-00728/28	CCTTGTTAGC	GACATGCGTT	TTTTGT	TAAC	GCGTCG	TTAC
				CpxR2			

			<b>-25</b>	<b>-35</b>		
S.T.	<b>CT 18</b>	ATGTCCGTGG	AAACATTTTT	AATAA <b>ACTCAC</b>	CCACGCGTGG	TATTTTGTTA
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	ATGTCCGTGG	AAACATTTTT	AATAA <b>ACTCAC</b>	CCACGCGTGG	TATTTTGTTA
S.E.	<b>PT 4</b>	ATGTCCGTGG	AAAA <b>A</b> TTTTT	AATAA <b>ACTCAC</b>	CCACGCGTGG	TATTTTGTTA
S.E.	<b>00-04026/62</b>	ATGTCCGTGG	AAAA <b>A</b> TTTTT	AATAA <b>ACTCAC</b>	CCACGCGTGG	TATTTTGTTA
S.E.	<b>00-04026/64</b>	ATGTCCGTGG	AAAA <b>A</b> TTTTT	AATAA <b>ACTCAC</b>	CCACGCGTGG	TATTTTGTTA
S.E.	<b>97-00728/26</b>	ATGTCCGTGG	AAAA <b>A</b> TTTTT	AATAA <b>ACTCAC</b>	CCACGCGTGG	TATTTTGTTA
S.E.	<b>97-00728/28</b>	ATGTCCGTGG	AAAA <b>A</b> TTTTT	AATAA <b>ACTCAC</b>	CCACGCGTGG	TATTTTGTTA

S.T.	<b>CT 18</b>	TTTAAGCTCA	TACCAAAGTG	CTAATAAAAC	GATAGCCATG	TGATTTTTTA
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	TTTAAGCTCA	TACCAAAGTG	CTAATAAAAC	GATAGCCATG	TGATTTTTTA
S.E.	<b>PT 4</b>	TTTAAGCTCA	TACCAAAGTG	CTAATAAAAC	GATAGCCATG	TGATTTTTTA
S.E.	<b>00-04026/62</b>	TTTAAGCTCA	TACCAAAGTG	CTAATAAAAC	GATAGCCATG	TGATTTTTTA
S.E.	<b>00-04026/64</b>	TTTAAGCTCA	TACCAAAGTG	CTAATAAAAC	GATAGCCATG	TGATTTTTTA
S.E.	<b>97-00728/26</b>	TTTAAGCTCA	TACCAAAGTG	CTAATAAAAC	GATAGCCATG	TGATTTTTTA
S.E.	<b>97-00728/28</b>	TTTAAGCTCA	TACCAAAGTG	CTAATAAAAC	GATAGCCATG	TGATTTTTTA

			<b>-129</b>		<b>-148</b>	<b>-152</b>
S.T.	<b>CT 18</b>	TAATTGATTT	TTGGCCACAG	AAGATAGTGT	ATCGCGCACC	TAAAAAATGA
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	TAATTGATTT	TTGGCCACAG	AAGATAGTGT	ATCGCGCACC	TAAAAAATGA
S.E.	<b>PT 4</b>	TAATTGATTT	TTGGCC <b>ATAG</b>	AAGATAGTGT	ATCGCG <b>A</b> ACC	CAAAAAATGA
S.E.	<b>00-04026/62</b>	TAATTGATTT	TTGGCC <b>ATAG</b>	AAGATAGTGT	ATCGCG <b>A</b> ACC	CAAAAAATGA
S.E.	<b>00-04026/64</b>	TAATTGATTT	TTGGCC <b>ATAG</b>	AAGATAGTGT	ATCGCG <b>A</b> ACC	CAAAAAATGA
S.E.	<b>97-00728/26</b>	TAATTGATTT	TTGGCC <b>ATAG</b>	AAGATAGTGT	ATCGCG <b>A</b> ACC	CAAAAAATGA
S.E.	<b>97-00728/28</b>	TAATTGATTT	TTGGCC <b>ATAG</b>	AAGATAGTGT	ATCGCG <b>A</b> ACC	CAAAAAATGA

						<b>-208</b>
S.T.	<b>CT 18</b>	AGTGTTGGTG	TGTGTTATGC	CGCCATGGGG	ATGTTCTTAT	GCTTCCCATG
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	AGTGTTGGTG	TGTGTTATGC	CGCCATGGGG	ATGTTCTTAT	GCTTCCCATG
S.E.	<b>PT 4</b>	AGTGTTGGTG	TGTGTTATGC	CGCCATGGGG	ATGTTCTTAT	GCTTCC <b>T</b> ATG
S.E.	<b>00-04026/62</b>	AGTGTTGGTG	TGTGTTATGC	CGCCATGGGG	ATGTTCTTAT	GCTTCC <b>T</b> ATG
S.E.	<b>00-04026/64</b>	AGTGTTGGTG	TGTGTTATGC	CGCCATGGGG	ATGTTCTTAT	GCTTCC <b>T</b> ATG
S.E.	<b>97-00728/26</b>	AGTGTTGGTG	TGTGTTATGC	CGCCATGGGG	ATGTTCTTAT	GCTTCC <b>T</b> ATG
S.E.	<b>97-00728/28</b>	AGTGTTGGTG	TGTGTTATGC	CGCCATGGGG	ATGTTCTTAT	GCTTCC <b>T</b> ATG

		<b>-212</b>		<b>-245</b>		
S.T.	<b>CT 18</b>	GGGGGCAATA	CGCACAAAGAC	GTGACACACT	TCGTTTTTTT	TTGTCTTTGT
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	TGGGGCAATA	CGCACAAAGAC	GTGACACACT	TCG-TTTTTT	TTGTCTTTGT
S.E.	<b>PT 4</b>	GGGGGCAATA	CGCACAAAGAC	GTGACACACT	TCG-TTTTTT	TTGTCTTTGT
S.E.	<b>00-04026/62</b>	GGGGGCAATA	CGCACAAAGAC	GTGACACACT	TCG-TTTTTT	TTGTCTTTGT
S.E.	<b>00-04026/64</b>	GGGGGCAATA	CGCACAAAGAC	GTGACACACT	TCG-TTTTTT	TTGTCTTTGT
S.E.	<b>97-00728/26</b>	GGGGGCAATA	CGCACAAAGAC	GTGACACACT	TCG-TTTTTT	TTGTCTTTGT
S.E.	<b>97-00728/28</b>	GGGGGCAATA	CGCACAAAGAC	GTGACACACT	TCG-TTTTTT	TTGTCTTTGT

			<b>-245</b>			
S.T.	<b>CT 18</b>	GCTGTCCAGG	TTAATGCCAC	GTCTCAAATT	TTAAGAAAAA	ATAAAATCAA
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	GCTGTCCAGG	TTAATGCCAC	GTCTCAAATT	TTAAGAAAAA	ATAAAATCAA
S.E.	<b>PT 4</b>	GCTGTCCAGG	TTAATGCC <b>TC</b>	GTCTCAAATT	TTAAGAAAAA	ATAAAATCAA
S.E.	<b>00-04026/62</b>	GCTGTCCAGG	TTAATGCC <b>TC</b>	GTCTCAAATT	TTAAGAAAAA	ATAAAATCAA
S.E.	<b>00-04026/64</b>	GCTGTCCAGG	TTAATGCC <b>TC</b>	GTCTCAAATT	TTAAGAAAAA	ATAAAATCAA
S.E.	<b>97-00728/26</b>	GCTGTCCAGG	TTAATGCC <b>TC</b>	GTCTCAAATT	TTAAGAAAAA	ATAAAATCAA
S.E.	<b>97-00728/28</b>	GCTGTCCAGG	TTAATGCC <b>TC</b>	GTCTCAAATT	TTAAGAAAAA	ATAAAATCAA

		-208	-204	-202			
S.T.	CT 18	AACATAACAT	ATAATAATTA	AAATGATTAA	AAATCAATGA	ATTATTATATAA	
S.Tm.	UMR 1	AACATAACAT	ATAATAATTA	AAATGATTAA	AAATCAATGA	ATTATTATATAA	
S.E.	PT 4	AACATGACAC	ACAATAATTA	AAATGATTAA	AAATCAATGA	ATTATTATATAA	
S.E.	00-04026/62	AACATGACAC	ACAATAATTA	AAATGATTAA	AAATCAATGA	ATTATTATATAA	
S.E.	00-04026/64	AACATGACAC	ACAATAATTA	AAATGATTAA	AAATCAATGA	ATTATTATATAA	
S.E.	97-00728/26	AACATGACAC	ACAATAATTA	AAATGATTAA	AAATCAATGA	ATTATTATATAA	
S.E.	97-00728/28	AACATGACAC	ACAATAATTA	AAATGATTAA	AAATCAATGA	ATTATTATATAA	
		IHF					
S.T.	CT 18	TTTGTATGAT	TTTTTAAATC	TATGCAATAA	CAGCGAAATG	TACAACCTTTA	
S.Tm.	UMR 1	TTTGTATGAT	TTTTTAAATC	TATGCAATAA	CAGCGAAATG	TACAACCTTTA	
S.E.	PT 4	TTTGTATGAT	TTTTTAAATC	TATGCAATAA	CAGCGAAATG	TACAACCTTTA	
S.E.	00-04026/62	TTTGTATGAT	TTTTTAAATC	TATGCAATAA	CAGCGAAATG	TACAACCTTTA	
S.E.	00-04026/64	TTTGTATGAT	TTTTTAAATC	TATGCAATAA	CAGCGAAATG	TACAACCTTTA	
S.E.	97-00728/26	TTTGTATGAT	TTTTTAAATC	TATGCAATAA	CAGCGAAATG	TACAACCTTTA	
S.E.	97-00728/28	TTTGTATGAT	TTTTTAAATC	TATGCAATAA	CAGCGAAATG	TACAACCTTTA	
Konsensus						ACNTTT	NGNTACANN
S.T.	CT 18	CTATCAAATC	TAAACTTCAA	AAAAACCCAA	AAACAACATTT	TAATA	TATA
S.Tm.	UMR 1	CTATCAAATC	TAAACTTCAA	AAAAACCCAA	AAACAACATTT	TAATA	TATA
S.E.	PT 4	CTATCAAATC	TAAACTTCAA	AAAAACCCAA	AAACAACATTT	TAATA	TATA
S.E.	00-04026/62	CTATCAAATC	TAAACTTCAA	AAAAACCCAA	AAACAACATTT	TAATA	TATA
S.E.	00-04026/64	CTATCAAATC	TAAACTTCAA	AAAAACCCAA	AAACAACATTT	TAATA	TATA
S.E.	97-00728/26	CTATCAAATC	TAAACTTCAA	AAAAACCCAA	AAACAACATTT	TAATA	TATA
S.E.	97-00728/28	CTATCAAATC	TAAACTTCAA	AAAAACCCAA	AAACAACATTT	TAATA	TATA
		OmpR D2					
Konsensus		TAT	-54	-52	-44	-35	
S.T.	CT 18	TTT	TTAC	ATC	TTG	TTAC	AAG
S.Tm.	UMR 1	TTT	TTAC	ATT	TGG	TTAC	AAG
S.E.	PT 4	TTT	TTAC	ATC	TTG	TTAC	AAT
S.E.	00-04026/62	TTT	TTAC	ATC	TTG	TTAC	AAG
S.E.	00-04026/64	TTT	TTAC	ATC	TTG	TTAC	AAG
S.E.	97-00728/26	TTT	TTAC	ATC	TTG	TTAC	AAT
S.E.	97-00728/28	TTT	TTAC	ATC	TTG	TTAC	AAG
		CpxR D1 OmpR					
		-10	+1				
S.T.	CT 18	TAGATTGTTT	TCAGTTAAAA	GTATTTTCGT	AAATATTTTT	CTCTTTCTGG	
S.Tm.	UMR 1	TAGATTGTTT	TCAGTTAAAA	GTATTTTCGT	AAATATTTTT	CTCTTTCTGG	
S.E.	PT 4	TAGATTGTTT	TCAGTTAAAA	GTATTTTCGT	AAATATTTTT	CTCTTTCTGG	
S.E.	00-04026/62	TAGATTGTTT	TCAGTTAAAA	GTATTTTCGT	AAATATTTTT	CTCTTTCTGG	
S.E.	00-04026/64	TAGATTGTTT	TCAGTTAAAA	GTATTTTCGT	AAATATTTTT	CTCTTTCTGG	
S.E.	97-00728/26	TAGATTGTTT	TCAGTTAAAA	GTATTTTCGT	AAATATTTTT	CTCTTTCTGG	
S.E.	97-00728/28	TAGATTGTTT	TCAGTTAAAA	GTATTTTCGT	AAATATTTTT	CTCTTTCTGG	
S.T.	CT 18	ATAATGGGCT	ATTTCAACCC	ACAGCAGTGC	AACATCTGTC	AGTACTTCTG	
S.Tm.	UMR 1	ATAATGGGCT	ATTTCAACCC	ACAGCAGTGC	AACATCTGTC	AGTACTTCTG	
S.E.	PT 4	ATAATGGGCT	ATTTCAACCC	ACAGCAGTGC	AACATCTGTC	AGTACTTCTG	
S.E.	00-04026/62	ATAATGGGCT	ATTTCAACCC	ACAGCAGTGC	AACATCTGTC	AGTACTTCTG	
S.E.	00-04026/64	ATAATGGGCT	ATTTCAACCC	ACAGCAGTGC	AACATCTGTC	AGTACTTCTG	
S.E.	97-00728/26	ATAATGGGCT	ATTTCAACCC	ACAGCAGTGC	AACATCTGTC	AGTACTTCTG	
S.E.	97-00728/28	ATAATGGGCT	ATTTCAACCC	ACAGCAGTGC	AACATCTGTC	AGTACTTCTG	

S.T.	<b>CT 18</b>	GTGCCTTTAT	TTTATGGGGG	CAGCTGTCAG	ATGTGCGATT	AAAAAAAGTG
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	GTGCCTTTAT	TTTATGGGGG	CAGCTGTCAG	ATGTGCGATT	AAAAAAAGTG
S.E.	<b>PT 4</b>	G~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	GTGCCTTTAT	TTTATGGGGG	CAGCTGTCAG	ATGTGCGATT	AAAAAAAGTG
S.E.	<b>00-04026/64</b>	GTGCCTTTAT	TTTATGGGGG	CAGCTGTCAG	ATGTGCGATT	AAAAAAAGTG
S.E.	<b>97-00728/26</b>	GTGCCTTTAT	TTTATGGGGG	CAGCTGTCAG	ATGTGCGATT	AAAAAAAGTG
S.E.	<b>97-00728/28</b>	GTGCCTTTAT	TTTATGGGGG	CAGCTGTCAG	ATGTGCGATT	AAAAAAAGTG

**Start *agfD***

S.T.	<b>CT 18</b>	GAGTTTCATC	ATGTTTAATG	AAGTCCATAG	TAGTCATGGT	CACACACTAT
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	GAGTTTCATC	ATGTTTAATG	AAGTCCATAG	TAGTCATGGT	CACACACTAT
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	GAGTTTCATC	ATGTTTAATG	AAGTCCATAG	TAGTCATGGT	CACACACTAT
S.E.	<b>00-04026/64</b>	GAGTTTCATC	ATGTTTAATG	AAGTCCATAG	TAGTCATGGT	CACACACTAT
S.E.	<b>97-00728/26</b>	GAGTTTCATC	ATGTTTAATG	AAGTCCATAG	TAGTCATGGT	CACACACTAT
S.E.	<b>97-00728/28</b>	GAGTTTCATC	ATGTTTAATG	AAGTCCATAG	TAGTCATGGT	CACACACTAT

S.T.	<b>CT 18</b>	TGTTGATCAC	AAAGCCATCT	CTGCAAGCTA	CGGCATTATT	GCAACATTTA
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	TGTTGATCAC	AAAGCCATCT	CTGCAAGCTA	CGGCATTATT	GCAACATTTA
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	TGTTGATCAC	AAAGCCATCT	CTGCAAGCTA	CGGCATTATT	GCAACATTTA
S.E.	<b>00-04026/64</b>	TGTTGATCAC	AAAGCCATCT	CTGCAAGCTA	CGGCATTATT	GCAACATTTA
S.E.	<b>97-00728/26</b>	TGTTGATCAC	AAAGCCATCT	CTGCAAGCTA	CGGCATTATT	GCAACATTTA
S.E.	<b>97-00728/28</b>	TGTTGATCAC	AAAGCCATCT	CTGCAAGCTA	CGGCATTATT	GCAACATTTA

S.T.	<b>CT 18</b>	AAGCAATCGC	TGGCCATAAC	CGGAAAACCTG	CATAATATTC	AACGTTCTCT
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	AAGCAATCGC	TGGCCATAAC	CGGAAAACCTG	CATAATATTC	AACGTTCTCT
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	AAGCAATCGC	TGGCCATAAC	CGGAAAACCTG	CATAATATTC	AACGTTCTCT
S.E.	<b>00-04026/64</b>	AAGCAATCGC	TGGCCATAAC	CGGAAAACCTG	CATAATATTC	AACGTTCTCT
S.E.	<b>97-00728/26</b>	AAGCAATCGC	TGGCCATAAC	CGGAAAACCTG	CATAATATTC	AACGTTCTCT
S.E.	<b>97-00728/28</b>	AAGCAATCGC	TGGCCATAAC	CGGAAAACCTG	CATAATATTC	AACGTTCTCT

**153**

S.T.	<b>CT 18</b>	GGAAGATATC	TCAGCCGGTT	GCATTGTTTT	AATGGATATG	ATGGAAGCGG
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	GGAAGATATC	TCAGCCGGTT	GCATTGTTTT	AATGGATATG	ATGGAAGCGG
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	GGAAGATATC	TCAGCCGGTT	GCATTGTTTT	AATGGATATG	ATGGAAGCGG
S.E.	<b>00-04026/64</b>	GGAAGATATC	TCAGCCGGTT	GCATTGTTTT	AATGGATATG	ATGGAAGCGG
S.E.	<b>97-00728/26</b>	GGAAGATATC	TCAGCCGGTT	GCATTGTTTT	AATGGATATG	ATGGAAGCGG
S.E.	<b>97-00728/28</b>	GGAAGATATC	TCAGCCGGTT	GCATTGTTTT	AATGGATATG	ATGGAAGCGG

S.T.	<b>CT 18</b>	ATAAGAAGCT	TATCCACTAT	TGGCAGGATA	ATTTAAGCCG	CAAAAACAAT
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	ATAAGAAGCT	TATCCACTAT	TGGCAGGATA	ATTTAAGCCG	CAAAAACAAT
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	ATAAGAAGCT	TATCCACTAT	TGGCAGGATA	ATTTAAGCCG	CAAAAACAAT
S.E.	<b>00-04026/64</b>	ATAAGAAGCT	TATCCACTAT	TGGCAGGATA	ATTTAAGCCG	CAAAAACAAT
S.E.	<b>97-00728/26</b>	ATAAGAAGCT	TATCCACTAT	TGGCAGGATA	ATTTAAGCCG	CAAAAACAAT
S.E.	<b>97-00728/28</b>	ATAAGAAGCT	TATCCACTAT	TGGCAGGATA	ATTTAAGCCG	CAAAAACAAT

S.T.	<b>CT 18</b>	AATATAAAAA	CATTATTGTT	AAATACCCCT	GACGATTATC	CCTACCGTGA
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	AATATAAAAA	CATTATTGTT	AAATACCCCT	GACGATTATC	CCTACCGTGA
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	AATATAAAAA	CATTATTGTT	AAATACCCCT	GACGATTATC	CCTACCGTGA
S.E.	<b>00-04026/64</b>	AATATAAAAA	CATTATTGTT	AAATACCCCT	GACGATTATC	CCTACCGTGA
S.E.	<b>97-00728/26</b>	AATATAAAAA	CATTATTGTT	AAATACCCCT	GACGATTATC	CCTACCGTGA
S.E.	<b>97-00728/28</b>	AATATAAAAA	CATTATTGTT	AAATACCCCT	GACGATTATC	CCTACCGTGA

330

S.T.	<b>CT 18</b>	AATTGAAAAC	TGGCCTCATA	TTAACGGCGT	GTTTTACGCC	ACTGAAGACC
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	AATTGAAAAC	TGGCCTCATA	TTAACGGCGT	GTTTTACGCT	ACTGAAGACC
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	AATTGAAAAC	TGGCCTCATA	TTAACGGCGT	GTTTTACGCC	ACTGAAGACC
S.E.	<b>00-04026/64</b>	AATTGAAAAC	TGGCCTCATA	TTAACGGCGT	GTTTTACGCC	ACTGAAGACC
S.E.	<b>97-00728/26</b>	AATTGAAAAC	TGGCCTCATA	TTAACGGCGT	GTTTTACGCC	ACTGAAGACC
S.E.	<b>97-00728/28</b>	AATTGAAAAC	TGGCCTCATA	TTAACGGCGT	GTTTTACGCC	ACTGAAGACC

378

S.T.	<b>CT 18</b>	AGGAACACGT	GGTCAGCGGA	TTACAGGGTA	TTCTGCGGGG	CGAATGCTAT
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	AGGAACACGT	GGTCAGCGGA	TTACAGGGTA	TTCTGCGTGG	CGAATGCTAT
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	AGGAACACGT	GGTCAGCGGA	TTACAGGGTA	TTCTGCGTGG	CGAATGCTAT
S.E.	<b>00-04026/64</b>	AGGAACACGT	GGTCAGCGGA	TTACAGGGTA	TTCTGCGTGG	CGAATGCTAT
S.E.	<b>97-00728/26</b>	AGGAACACGT	GGTCAGCGGA	TTACAGGGTA	TTCTGCGTGG	CGAATGCTAT
S.E.	<b>97-00728/28</b>	AGGAACACGT	GGTCAGCGGA	TTACAGGGTA	TTCTGCGTGG	CGAATGCTAT

423

S.T.	<b>CT 18</b>	TTTTACAAA	AATTAGCCAG	TTACCTGATT	ACCACTCAG	GAAATTACCG
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	TTTTACAAA	AATTAGCCAG	TTACCTGATT	ACGCACTCAG	GAAATTACCG
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	TTTTACAAA	AATTAGCCAG	TTACCTGATT	ACGCACTCAG	GAAATTACCG
S.E.	<b>00-04026/64</b>	TTTTACAAA	AATTAGCCAG	TTACCTGATT	ACGCACTCAG	GAAATTACCG
S.E.	<b>97-00728/26</b>	TTTTACAAA	AATTAGCCAG	TTACCTGATT	ACGCACTCAG	GAAATTACCG
S.E.	<b>97-00728/28</b>	TTTTACAAA	AATTAGCCAG	TTACCTGATT	ACGCACTCAG	GAAATTACCG

S.T.	<b>CT 18</b>	CTACAACAGC	ACCGAGTCCG	CATTACTCAC	TCATCGCGAA	AAAGAGATCC
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	CTACAACAGC	ACCGAGTCCG	CATTACTCAC	TCATCGCGAA	AAAGAGATCC
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	CTACAACAGC	ACCGAGTCCG	CATTACTCAC	TCATCGCGAA	AAAGAGATCC
S.E.	<b>00-04026/64</b>	CTACAACAGC	ACCGAGTCCG	CATTACTCAC	TCATCGCGAA	AAAGAGATCC
S.E.	<b>97-00728/26</b>	CTACAACAGC	ACCGAGTCCG	CATTACTCAC	TCATCGCGAA	AAAGAGATCC
S.E.	<b>97-00728/28</b>	CTACAACAGC	ACCGAGTCCG	CATTACTCAC	TCATCGCGAA	AAAGAGATCC

531

S.T.	<b>CT 18</b>	TCAATAAGTT	ACGTATTGGT	GCCTCTAATA	ATGAAATCGC	CAGGTCGCTA
S.Tm.	<b>UMR 1</b>	TCAATAAGTT	ACGTATTGGT	GCCTCTAATA	ATGAAATCGC	GAGGTCGCTA
S.E.	<b>PT 4</b>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	<b>00-04026/62</b>	TCAATAAGTT	ACGTATTGGT	GCCTCTAATA	ATGAAATCGC	GAGGTCGCTA
S.E.	<b>00-04026/64</b>	TCAATAAGTT	ACGTATTGGT	GCCTCTAATA	ATGAAATCGC	GAGGTCGCTA
S.E.	<b>97-00728/26</b>	TCAATAAGTT	ACGTATTGGT	GCCTCTAATA	ATGAAATCGC	GAGGTCGCTA
S.E.	<b>97-00728/28</b>	TCAATAAGTT	ACGTATTGGT	GCCTCTAATA	ATGAAATCGC	GAGGTCGCTA

S.T.	CT 18	TTTATCAGCG	AGAATACGGT	TAAGACACAT	CTTTATAATC	TTTTCAAAAA
S.Tm.	UMR 1	TTTATCAGCG	AGAATACGGT	TAAGACACAT	CTTTATAATC	TTTTCAAAAA
S.E.	PT 4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	00-04026/62	TTTATCAGCG	AGAATACGGT	TAAGACACAT	CTTTATAATC	TTTTCAAAAA
S.E.	00-04026/64	TTTATCAGCG	AGAATACGGT	TAAGACACAT	CTTTATAATC	TTTTCAAAAA
S.E.	97-00728/26	TTTATCAGCG	AGAATACGGT	TAAGACACAT	CTTTATAATC	TTTTCAAAAA
S.E.	97-00728/28	TTTATCAGCG	AGAATACGGT	TAAGACACAT	CTTTATAATC	TTTTCAAAAA
627						
S.T.	CT 18	GATAGCTGTC	AAAAATCGCA	CCCAGGCAGT	TTCATGAGCA	AACGATAATC
S.Tm.	UMR 1	GATAGCTGTC	AAAAATCGCA	CCCAGGCAGT	TTCATGGGCA	AACGATAATC
S.E.	PT 4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	00-04026/62	GATAGCTGTC	AAAAATCGCA	CCCAGGCAGT	TTCATGGGCA	AACGATAATC
S.E.	00-04026/64	GATAGCTGTC	AAAAATCGCA	CCCAGGCAGT	TTCATGGGCA	AACGATAATC
S.E.	97-00728/26	GATAGCTGTC	AAAAATCGCA	CCCAGGCAGT	TTCATGGGCA	AACGATAATC
S.E.	97-00728/28	GATAGCTGTC	AAAAATCGCA	CCCAGGCAGT	TTCATGGGCA	AACGATAATC
Ende <i>agfD</i> Start <i>agfE</i>						
S.T.	CT 18	TCAGGCGGTA	AGGCCATGAA	ACGCTATCTG	ACCTGGATTG	TAGCAGCAGA
S.Tm.	UMR 1	TCAGGCGGTA	AGGCCATGAA	ACGCTATCTG	ACCTGGATTG	TAGCAGCAGA
S.E.	PT 4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S.E.	00-04026/62	TCAGGCGGTA	AGGCCATGAA	ACGCTATCTG	ACCTGGATTG	TAGCAGCAGA
S.E.	00-04026/64	TCAGGCGGTA	AGGCCATGAA	ACGCTATCTG	ACCTGGATTG	TAGCAGCAGA
S.E.	97-00728/26	TCAGGCGGTA	AGGCCATGAA	ACGCTATCTG	ACCTGGATTG	TAGCAGCAGA
S.E.	97-00728/28	TCAGGCGGTA	AGGCCATGAA	ACGCTATCTG	ACCTGGATTG	TAGCAGCAGA

**Abb. 31:** Intergenische Region und *agfD*-Gen des *S. Typhi*-Stammes CT 18, des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1 sowie verschiedener *S. Enteritidis*-Stämme: Mutationen gegenüber der entsprechenden UMR 1-Sequenz sind in fett gedruckt und die entsprechenden Positionen bezogen auf den *agfB*- bzw. *agfD*-Transkriptionsstart angegeben. Die Positionsangaben der Mutationen innerhalb des *agfD*-Leserahmens beziehen sich auf den *agfD*-Translationsstart. Dargestellte Genabschnitte, die beiden OmpR-Bindungsstellen D1 und D2, die IHF-Bindungsstelle, -35- Regionen, -10-Regionen und die beiden Transkriptionsstartpunkte sind farbig unterlegt. Start- bzw. Stoppcodons sind unterstrichen. Die CpxR-Bindungsstelle ist eingekästelt. Die OmpR-Konsensussequenz befindet sich über den Sequenzen. Rot markierte Basen stellen Abweichungen von der OmpR-Konsensus-Bindungsstellensequenz dar. N = Nukleotid; S.T. = *S. Typhi*; S.Tm. = *S. Typhimurium*; S.E. = *S. Enteritidis*

Die drei Punktmutationen, die bei den *S. Enteritidis*-Stämmen aufgedeckt wurden und sich in der OmpR-Bindungsstelle unmittelbar vor der -35-Region des *agfD*-Promotors befanden, sollen nun einmal näher betrachtet werden, da sie möglicherweise direkten Einfluss auf die Transkription des *agfD* ausüben könnten.

Die beiden Mutationen an Position -54 und -52 traten bei allen *S. Enteritidis*-Stämmen sowie dem *S. Typhi*-Stamm auf, wobei die Mutation an Position -54 eine Abweichung von der Konsensus-Bindungssequenz des OmpR darstellte. Die Mutation an Position -52 lag hingegen in einem basentoleranten Bereich. Diese beiden Punktmutationen schienen sich jedoch kaum auf die Expression des *agfD* auszuwirken. So entsprachen die Phänotypen der entsprechenden Stämme mit Ausnahme des Stammes 00-04026/62 annähernd dem des Stammes UMR 1.

Die interessanteste Mutation jedoch, die lediglich bei den beiden *S. Enteritidis*-Stämmen PT 4 und 97-00728/26 auftrat und ebenfalls eine Abweichung von der Konsensus-Bindungssequenz des OmpR darstellte, befand sich an Position -44. Der Stamm 97-00728/26 zeigte den Phänotyp *rdar*<sup>+</sup>/*rdar*<sup>+</sup> anstelle von *rdar*<sup>+</sup>/*saw*(bb)(+). Angaben bezüglich des Phänotyps des Stammes PT 4 lagen bedauerlicherweise nicht vor. Dieselbe Mutation war auch bei der Mutante SR-11b des *S. Typhimurium*-Stammes SR-11 festgestellt worden (RÖMLING ET AL., 1998B). Dieser Stamm zeigte - analog zu 97-00728/26 - ebenfalls den Phänotyp *rdar*<sup>+</sup>/*rdar*<sup>+</sup>. Eine mögliche Begründung für diesen Sachverhalt wäre, dass bei den beiden Stämmen ein spezifischer Inhibitor auf Grund dieser Mutation nicht mehr an die DNS binden konnte und somit die OmpR-Bindungsstelle permanent frei war. Alternativ könnte auch OmpR stärker binden. Eine mutationsbedingte vollständige Entkopplung des *agfD* von OmpR schied

als Hypothese definitiv aus, da die Phagentransduktionsexperimente gezeigt hatten, dass OmpR immer noch für die Expression von AgfD gebraucht wird (s. Tab. 17). Inwieweit die einzelnen Punktmutationen im *agfD*-Promotorbereich die Transkription des *agfD* beeinflussten und sich somit in der Ausprägung der Phänotypen widerspiegeln ist in Tab. 19 noch einmal zusammengestellt.

**Tab. 19:** Gegenüberstellung von Phänotyp (28° C/37° C) und den entsprechenden Mutationen im *agfD*-Promotor bei *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*

Serotyp	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	Mutation
<i>S. Typhimurium</i>	UMR 1	rdar+/saw(bb)(+)	Mustersequenz
<i>S. Typhimurium</i>	00-03876/71	rbdar(+)/saw(bb)-	-91
<i>S. Typhimurium</i>	00-03876/72	rdar(+)/saw(bb)-	-91
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-08774	saw(bb)-/saw(bb)-	-33
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-07478	saw(bb)-/saw(bb)-	-33
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-07087	saw(g)-/saw(g)-	-57; -33
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-06699	saw(bb)-/saw(g)-	-33
<i>S. Typhimurium</i> var. Copenhagen	00-06506	saw(bb)-/saw(bb)-	-33
<i>S. Enteritidis</i>	00-04026/62	rdar+/pdar+	-54; -52
<i>S. Enteritidis</i>	00-04026/64	rbdar+/saw(bb)-	-54; -52
<i>S. Enteritidis</i>	97-00728/26	rdar+/rdar+	-54 ; -52 ; -44
<i>S. Enteritidis</i>	97-00728/28	rbdar+/saw(bb)-	-54 ; -52

Mutationen an den Positionen -91, -57, -54 und -52 hatten also offensichtlich nur einen geringen Effekt auf die Transkriptionsrate des *agfD*, während Mutationen an Position -33 bzw. -44 die Biofilmbildung gänzlich unterbanden bzw. verstärkten.

## III.2. Das *adrA*-Gen von *S. Typhimurium*

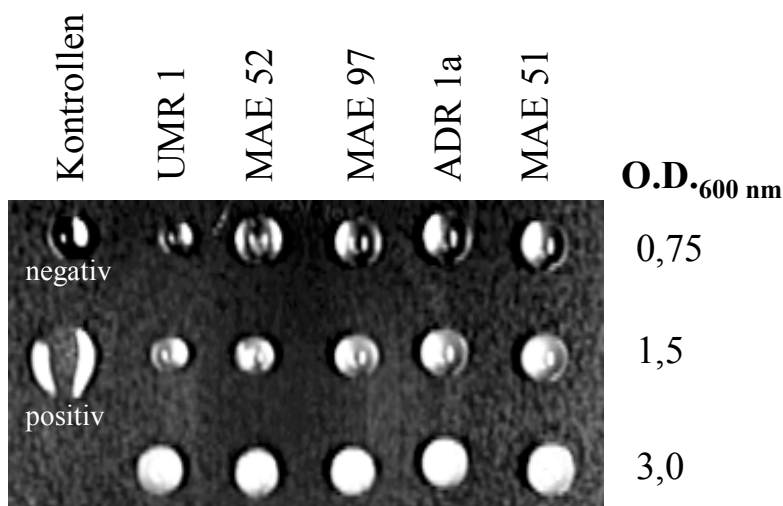
Wie in Kapitel I.3.4.3. bereits erwähnt, spielt das *adrA*-Gen bei *S. Typhimurium* und *E. coli* eine Rolle bei der Regulation der Zelluloseproduktion in der stationären Wachstumsphase unter biofilminduzierenden Bedingungen. Es wird vermutet, dass das Produkt des *adrA*-Gens, das AdrA, als eine Art positiver Effektor mit einem oder mehreren Produkten des *bcsABZC*-Operons direkt oder indirekt interagiert und so die Expression von Zellulose steuert. Dies erfolgt möglicherweise über die Bindung bzw. Produktion von c-di-GMP (RÖMLING 2002). Das *adrA* ist auf Transkriptionsebene zu 100 % abhängig von AgfD und zu 50 % von  $\sigma^S$  (RÖMLING ET AL., 2000). Die vermutliche zytosolische Domäne enthält ein sogenanntes GGDEF-Motiv, welches zwischen zahlreichen bakteriellen Proteinen verschiedener Funktion hochkonserviert ist (RÖMLING 2002). Homologie dieser Domäne zur eukaryotischen Adenylzyklase impliziert, dass die Funktion dieser Domäne möglicherweise die einer Nukleotid-Zyklase ist (PEI & GRISHIN 2001; RÖMLING 2002).

### III.2.1. Begleitende Parameter der Biofilmbildung:

#### III.2.1.1. Tensidbildung:

Einige *S. Typhimurium*-Stämme mit starker Biofilmbildung können innerhalb weniger Tage die gesamte Oberfläche von Agarplatten kolonisieren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die biofilmbildenden Salmonellen Substanzen absondern, die die Oberflächenspannung von Wasser herabsetzen. Um diesen Sachverhalt zu prüfen wurden verschiedene Mutanten des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028 einem Oberflächenspannungstest (s. Kapitel II.5.6.) unterzogen.

Folgende Stämme wurden überprüft: UMR 1, MAE 52, MAE 97, ADR 1a und MAE 51 (Erläuterungen zu den Stämmen s. Kapitel II.4.1.). Die Stämme wurden alle bei 37° C angezogen. Abb. 32 zeigt das Ergebnis.



**Abb. 32:** Oberflächenspannungstest bei ausgewählten *S. Typhimurium*-Stämmen: Die Zellsuspensionen sind in 0,9 %iger NaCl-Lösung angesetzt. Als Negativkontrolle diente ebenfalls 0,9 %ige NaCl-Lösung, als Positivkontrolle 1 %ige SDS-Lösung.

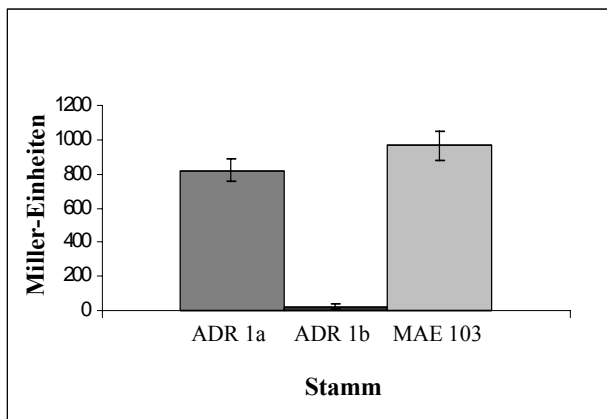
Aus Abb. 32 ist zu ersehen, dass alle Tropfen unabhängig von Stamm und Suspensionsstärke von ihrer Form her eher der Negativ- als der Positivkontrolle ähneln. Somit scheint keiner dieser *S. Typhimurium*-Stämme oberflächenspannungsherabsetzende Stoffe abzusondern.



### III.2.2. Untersuchungen zur Vermittlerfunktion des *adrA*-Gens zwischen *agfD* und *bcsABZC*:

#### III.2.2.1. Abhängigkeit des *adrA* von Produkten des *agfBAC*-Operons:

Die Abhängigkeit der Expression des *adrA* von AgfD ist bekannt (RÖMLING ET AL., 1998B). Anders sieht es mit einer eventuell bestehenden Abhängigkeit der Transkription des *adrA* von Produkten des *agfBAC*-Operons aus. Um zu überprüfen, ob das *adrA* tatsächlich von Produkten dieses Operons abhängig ist, wurde die Transkription des *adrA*-Genes in *agfBAC*-positiven und -negativen Stämmen gemessen. Die Messung der Transkriptionsrate des *adrA*-Genes erfolgte indirekt über  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitätsmessungen mit Mutanten des *S. Typhimurium*-Stammes MAE 52, die eine MudJ-Kassette im *adrA*-Gen trugen. Stamm ADR 1a resultiert aus der Transduktion einer MudJ-Kassette im *adrA*-Gen, die in den Stamm MAE 52 eingebracht worden war. Deshalb sind alle Gene abgesehen vom *adrA* voll funktionsfähig. Dieser Stamm fungierte als Positivkontrolle.



**Abb. 33:**  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitätsmessungen bei verschiedenen *S. Typhimurium*-Stämmen, die eine MudJ-Kassette im *adrA* tragen: Erklärungen zu den Stämmen befinden sich im Text.

Der Stamm ADR 1b zeichnet sich dadurch aus, dass er neben besagter MudJ-Kassette im *adrA* ein defektes *agfD*-Gen besitzt. Der Stamm MAE 103 trägt zusätzlich zur MudJ-Kassette im *adrA* ein nicht funktionsfähiges *agfBAC*-Operon.

Abb. 33 zeigt eindeutig, dass keine Abhängigkeit der Transkription des *adrA* von Produkten des *agfBAC*-Operons besteht. Wäre dies der Fall, so hätte der Stamm MAE 103 eine reduzierte oder erhöhte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität aufweisen müssen. Dass der Stamm ADR 1b so gut wie keine Transkriptionsaktivität des *adrA*-Gens zeigte, unterstreicht noch einmal die Tatsache, dass das *adrA* zu 100 % von AgfD abhängig ist.

#### III.2.2.2. Werden zur Zellulosebiosynthese außer *adrA* noch weitere von AgfD abhängige Gene benötigt?

Um dieser Frage nachzugehen wurde das *adrA*-Gen mittels PCR amplifiziert und sowohl in den High-Copy-Vektor pASK75 (SKERRA 1994) als auch in den Low-Copy-Vektor pBAD30 (GUZMAN ET AL., 1995) kloniert (s. Kapitel II.9.). Hierfür fanden die Primerpaare PBAD30.YAIC.A mit PASK75.YAIC.E bzw. PBAD30.YAIC.A mit PBAD30.YAIC.E Anwendung (s. Kapitel II.8.1.5.2.). Um die Expression der Vektorkonstrukte zu optimieren, wurde in den Primer PBAD30.YAIC.A eine optimale Shine-Dalgarno-Sequenz eingefügt. Das fertige pASK75-Vektorkonstrukt wurde mit pWJB1, das entsprechende pBAD30-Vektorkonstrukt mit pWJB30 bezeichnet. Die Konstrukte wurden in den *agfD*-

Negativmutanten ADR 1b (MAE 51 *adrA101::MudJ*) und MAE 50 (UMR1  $\Delta agfD101$ ) sowie dem Stamm ADR 1a (MAE 52 *adrA101::MudJ*) getestet. Der Promotor von pWJB1 wurde durch 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin, der Promotor von pWJB30 mit 0,1 % L-Arabinose aktiviert.

Wie sich zeigte, erfolgte lediglich in Fall des Low-Copy-Konstruktes eine vollständige Komplementation zum Wildtyp bezogen auf den Grad der Zelluloseproduktion. Diese Komplementation wurde als Phänotypänderung auf CR-Platten von saw zu pdar bei den beiden Stämmen MAE 50 und ADR 1b sowie von bdar zu rdar beim Stamm ADR 1a bei 28° C und 37° C gemessen.

Im Falle des High-Copy-Konstruktes trat keine sichtbare Änderung des Phänotyps ein, was darauf hindeutete, dass hier die AdrA-Expression aktiv von der Zelle unterbunden wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das AdrA in hohen Konzentrationen für die Zelle toxisch ist.

Die Abb. 34 zeigt das Ergebnis der Komplementation der *agfD*-Negativmutante ADR 1b vom weißen zum pinkfarbenen Phänotyp durch das Low-Copy-Konstrukt pWJB30.



**Abb. 34:** Komplementation vom weißen zum pinkfarbenen Phänotyp durch pWJB30 beim *S. Typhimurium*-Stamm ADR 1b: Erläuterungen zum Stamm ADR 1b befinden sich in Kapitel III.2.2.1.

Die Komplementation zum Wildtyp durch pWJB30 lässt bezüglich der Regulationskaskade, die letztendlich zur Produktion von Zellulose führt, zwei Schlüsse zu. Zum einen ist eindeutig, dass zwischen Transkription des *adrA* und der Zelluloseproduktion kein weiterer Schritt besteht, der abhängig von AgfD ist. Wäre dies der Fall, so hätte keine vollständige Komplementation stattfinden können. Zum anderen scheint die polare Knock-out von *adrA* durch die MudJ-Kassette keine stromabwärts liegenden Gene, die die Zelluloseproduktion beeinflussen könnten, zu beeinträchtigen. Wäre dies der Fall, so wäre die Komplementation ebenfalls nur teilweise oder gar nicht erfolgt.

### III.2.2.3. Beeinflusst die polare Insertion im *adrA* stromabwärts liegende Gene?



**Abb. 35:** Lage des *adrA* auf dem Chromosom zwischen *psiF* und *proC*: Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der entsprechenden Gene an.

Ob polare Mutationen im *adrA* stromabwärts gelegene Gene beeinflussen, sollte experimentell überprüft werden. In den *S. Typhimurium*-Stamm MAE 52 wurde eine Gendeletion im

Leserahmen in das *adrA*-Gen eingebracht. Wie in Kapitel II.9.5. beschrieben, wurden hierfür zunächst ein vorderes bzw. ein hinteres kurzes Teilstück des *adrA* mit einem Stück stromauf bzw. stromab angrenzender DNS mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifikation des vorderen Teilstückes wurde das Primerpaar PSI F-2 - ADRA.A.RAUS-2 verwendet, für die Amplifikation des hinteren Teilstückes das Primerpaar ADRA.R.RAUS - PROC (s. Kapitel II.8.1.5.2.). Beide Teilstücke wurden miteinander in den temperatursensitiven Vektor pMAK700 zum Vektorkonstrukt pWJB5 ligiert. Dieses Konstrukt wurde letztendlich in den Zielstamm MAE 52 elektroporiert. Durch homologe Rekombinationsereignisse - induziert durch Temperaturshifts - wurde dann auf dem Chromosom das intakte *adrA* gegen das stark verkürzte - nicht mehr funktionsfähige - *adrA* des Vektorkonstruktes ausgetauscht. Der resultierende Stamm wurde als MAE 229 bezeichnet. Anschließend wurde der CR-Phänotyp dieses Stammes bei 28° C und 37° C überprüft. Es stellte sich heraus, dass der Phänotyp dieses Stammes erwartungsgemäß bdar/bdar war. Die Zelluloseproduktion war somit in diesem Stamm vollständig unterbunden. Anschließend wurde das Vektorkonstrukt pWJB30 in den Stamm MAE 229 elektroporiert und angeschaltet. Auf CR-Agarplatten mit 0,1 % L-Arabinose war sowohl bei 28° C als auch bei 37° C eine vollständige Komplementation zum Phänotyp rdar zu beobachten, die sich nicht von dem Phänotyp der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Komplementation unterschied. Dies zeigt, dass polare Mutationen im *adrA*-Gen stromabwärts liegende Gene nachweislich nicht beeinflussten.

#### III.2.2.4. Reicht die zytosolische Domäne des AdrA zur Komplementation aus?

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass das AdrA aus einem N-terminalen Transmembranbereich und einem C-terminalen vermutlich zytosolischen Bereich besteht. Der zytosolische Bereich steht im Verdacht die eigentliche funktionelle Einheit des AdrA darzustellen (RÖMLING 2002). Folglich ist anzunehmen, dass dieser Bereich zur Komplementation ausreichen sollte. Um diesen Sachverhalt zu prüfen wurde der zytosolische Bereich des AdrA im High-Copy-Vektor pGEX 6p-1 mit einem Protein - der Glutathion-S-Transferase - fusioniert. Hierfür wurden die Primer GGDEF-START und HYDR.YAIC.E verwendet (s. Kapitel II.8.1.5.2.). Das fertige Vektorkonstrukt wurde mit pWJB10 bezeichnet und in den Stämmen MAE 103 (MAE 52 *agfBA102 adrA101::MudJ*) und MAE 97 (MAE 52 *ΔagfBA102*) getestet. Nach dem Anschalten des Promotors durch 1 mM IPTG konnte jedoch keine Änderung im Phänotyp beobachtet werden. Folglich scheint für die Zelluloseproduktion das vollständige AdrA notwendig zu sein.

Allerdings sei hier noch einmal erwähnt, dass es sich bei dem Vektor pGEX 6p-1 um einen High-Copy-Vektor handelt. Da durch das High-Copy-Konstrukt pWJB1, welches das vollständige *adrA* enthielt, ebenfalls keine Komplementation erzielt werden konnte (s. Kapitel III.2.2.3.), könnte der Grund für das Misslingen der Komplementation durch das Teilkonstrukt pWJB10 ebenfalls in einer übermäßigen Expression des *adrA*-Teilproteins zu finden sein.

#### III.2.2.5. Gibt es zwischen Transkription des *adrA* und Zelluloseproduktion noch Schritte, die von OmpR oder $\sigma^S$ abhängig sind?

Um dieser Frage nachzugehen wurden aus den Stämmen MAE 51 und MAE 52 mittels Phagentransduktion *ompR*- und *rpoS*-Knock-Out-Mutanten hergestellt. Hierfür wurden die Insertionen in den entsprechenden Genen der Stämme JF2757 (*ompR43::MudJ*) bzw. CC1000 (ATCC 14028-1s *rpoS::Tc<sup>r</sup>*) in die beiden Zielstämme transduziert. Die *rpoS*-Negativmutanten wurden mit dem Katalasetest überprüft. Bei den *ompR*-Negativmutanten erfolgte die Kontrolle

über eine erneute Phagentransduktion, bei der die Km-Kassette gegen die Amp-Kassette des Stammes MAE 49 ausgetauscht wurde. Nur Klone, die nach diesem Test ihre Km-Resistenz verloren hatten und nun stattdessen resistent gegen Ampicilin geworden waren, wurden weiterverwendet. Die Phänotypen der resultierenden Mutanten waren erwartungskonform, wie Tab. 20 zeigt.

**Tab. 20:** Phänotypen von *ompR*- und *rpoS*-Negativmutanten der *S. Typhimurium*-Stämme MAE 51 und MAE 52

Stamm	Genotyp	Phänotyp (28° C/37° C)
MAE 225	MAE 51 <i>rpoS</i> ::Tc <sup>r</sup>	saw(bb)/saw(bb)
MAE 226	MAE 52 <i>rpoS</i> ::Tc <sup>r</sup>	bdar/bdar
MAE 227	MAE 51 <i>ompR43</i> ::MudJ; Km <sup>r</sup>	saw(bb)/saw(bb)
MAE 228	MAE 52 <i>ompR43</i> ::MudJ; Km <sup>r</sup>	saw(bb)/saw(bb)

Das Vektorkonstrukt pWJB30 wurde in die vier in Tab. 20 aufgeführten Stämme elektroporiert und der Promotor - wie vorher beschrieben - durch 0,1 % L-Arabinose induziert. In allen Stämmen trat eine Komplementation auf, die auf CR-Agarplatten beobachtet werden konnte. Die Beobachtungen erfolgten bei 28° C und 37° C. Die Stämme MAE 225, MAE 227 und MAE 228 zeigten den Phänotyp pdar/pdar, der Stamm MAE 226 den Phänotyp rdar/rdar. Diese Ergebnisse zeigen, dass nach der Transkription des *adrA* in keinem weiteren Schritt OmpR bzw.  $\sigma^S$  zur Zelluloseproduktion benötigt wird. Zugleich zeigen sie, dass die Expression des *adrA* ausreicht, um eine temperaturunabhängige Zelluloseproduktion zu erhalten.

### III.2.2.6. Ist das *agfD*-Gen nach der Transkription abhängig von OmpR?

Um zu testen, ob das *agfD*-Gen nach erfolgter Transkription z.B. in seiner Aktivität abhängig von OmpR ist, wurde ein pBAD30-Konstrukt, welches das vollständige *agfD*-Gen enthielt (pUMR 15; s. Kapitel II.9.1.), in die sowohl *agfD*- als auch *ompR*-negative Mutante MAE 227 gebracht und der Promotor mit 0,1 % L-Arabinose angeschaltet. Es trat vollständige Komplementation zum rdar/rdar-Phänotyp auf. Somit ist die Translation und die Aktivität des *agfD*-Genes von OmpR unabhängig.

### III.2.2.7. Funktioniert die Komplementation durch pWJB30 auch bei Vertretern anderer Spezies?

Der *E. coli*-Stamm MC4100 exprimiert keine Zellulose, was sich aus seinem Phänotyp bas/saw auf CR-Agarplatten ergibt. Um zu testen, ob in diesem Stamm das *adrA*-Gen defekt sein könnte, wurde das Vektorkonstrukt pWJB30 in diesen Stamm sowie zusätzlich in den *E. coli*-Stamm Y-Mel mit dem CR-Phänotyp rdar/saw elektroporiert und der Konstruktpromotor wie üblich mittels 0,1 % L-Arabinose angeschaltet. Eine Änderung des Phänotyps konnte jedoch bei keinem der beiden Stämme festgestellt werden. Der Stamm MC4100 zeigte eine gewisse Arabinoseunverträglichkeit, die sich durch allgemein schlechtes Wachstum sowie sekundäre Koloniebildung auf der Kolonieoberfläche äußerte.

Ein ähnliches Experiment wurde mit dem *Pseudomonas putida*-Stamm KT2440 durchgeführt. *P. putida* wurde untersucht, weil durch In-Silico-Analyse in seinem Genom homologe Gene zur Zelluloseproduktion gefunden worden waren (RÖMLING 2002). In diesem Stamm funktioniert das Vektorkonstrukt pWJB30 nicht, da die *ori*-Region dieses Plasmides von entsprechenden Replikationsfaktoren von *P. putida* nicht erkannt wird. So wurde für diesen Versuch pWJB9 geschaffen.

Zunächst wurde das Teilstück zwischen *Xba*I- bis zur *Hind*III-Schnittstelle des Vektorkonstruktes pWJB30 mittels PCR amplifiziert, welches den *araC*-Repressor, den

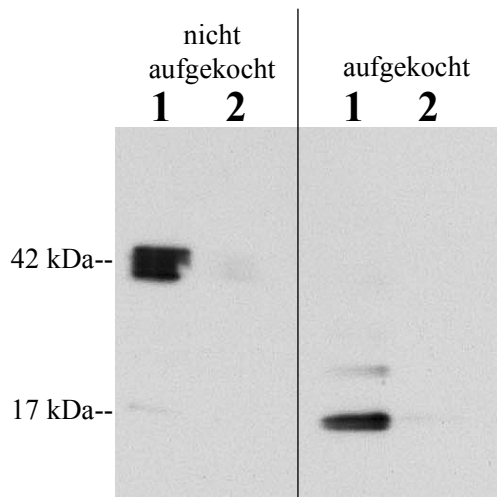
arabinoseinduzierbaren Promotor sowie das hineinklonierte *adrA*-Gen enthielt. Hierfür wurden die beiden Primer ARA-C und BLA-30 verwendet (s. Kapitel II.8.1.5.2.). Dieses 3000 bp große PCR-Produkt wurde dann in den 22 kb großen Vektor pLAFR3 hineinkloniert und zwar so, dass das *adrA*-Gen mit dem arabinoseinduzierbaren Promotor in Gegenrichtung zum benachbarten *lacZ*-Gen des pLAFR3-Vektors zu liegen kam. So konnten Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Genen ausgeschlossen werden.

Das resultierende Vektorkonstrukt pWJB9 wurde mittels Triparental Mating (s. Kapitel II.9.2.3.) in den Zielstamm sowie in den *S. Typhimurium*-Stamm MAE 103 gebracht. Die Inkubation des *P. putida*-Stammes erfolgte bei 28° C, da *P. putida* bei dieser Temperatur optimal wächst. Nach Anschalten des Promotors durch 0,1 % L-Arabinose konnte im Kontrollstamm MAE 103 eine Phänotypwandlung von saw/saw zu pdar/pdar beobachtet werden, was zeigt, dass das Vektorkonstrukt im Prinzip funktionierte. Beim *P. putida*-Stamm KT2440 konnte jedoch nach Anschalten des Promotors keine Phänotypänderung festgestellt werden. Somit zeigte sich, dass bei *P. putida* eine erhöhte AdrA-Expression nicht zur Zellulosebiosynthese ausreicht.

### III.2.3. Untersuchungen zum AdrA-Protein:

#### III.2.3.1. Nachweis des AdrA im Western Blot:

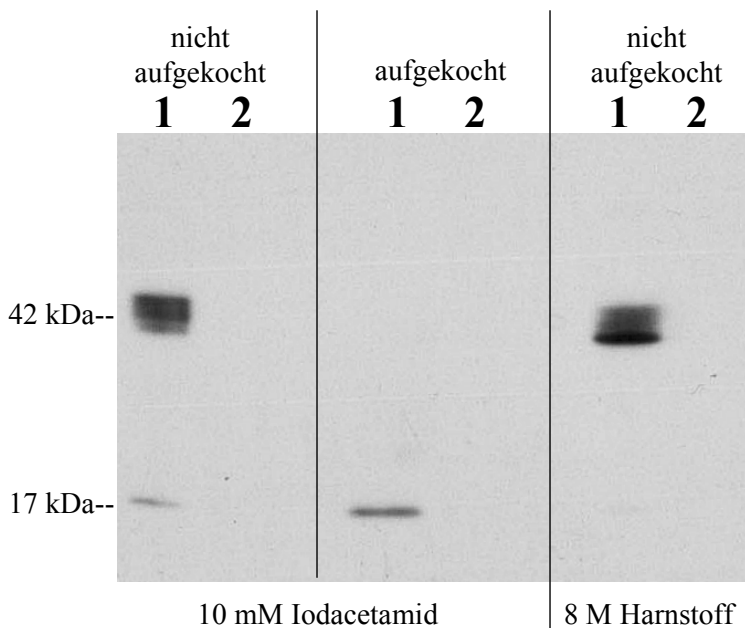
Im Vektorkonstrukt pWJB30 wurde das AdrA mit einem Poly-His-tag versehen. Mit Hilfe des  $\alpha$ -Tetra-His-Antikörpers der Firma Qiagen konnte gezielt dieser C-terminale Polyhistidinschwanz detektiert werden. Hierfür wurde der Stamm MAE 103 (pWJB30) unter induzierenden Bedingungen angezogen und der Gesamtproteingehalt der Kultur wie in Kapitel II.6.1.1. beschrieben erhalten. Danach wurde eine gewöhnliche SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunoblotdetektion durchgeführt.



**Abb. 36:** Spezifische AdrA-Signale bei 42 bzw. 17 kDa auf einem Western Blot: Die Proben wurden mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt und im einen Fall aufgekocht, im anderen Fall nicht. **1:** *S. Typhimurium* MAE 103 (pWJB30); **2:** *S. Typhimurium* MAE 103 (pBAD30)

Wie aus Abb. 36 ersichtlich, wurde im Western Blot ein spezifisches AdrA-Signal detektiert, welches nur beim Stamm mit dem Vektorkonstrukt pWJB30 nachzuweisen war. Jedoch war das Laufverhalten des Proteins im SDS-Gel je nach Probenaufbereitung unterschiedlich. Wurden die Proben – wie im Standardprotokoll beschrieben – vor dem Auftrag auf das Gel aufgekocht, so befand sich das AdrA-Signal auf der Höhe von 17 kDa. Wurden die Proben jedoch nicht aufgekocht, so wurde das Signal auf der Höhe von 42 kDa nachgewiesen, was dem errechneten relativen Molekulargewicht des AdrA von 41,5 kDa nahekommt. Folglich erwies sich das Aufkochen der Proben im Falle des AdrA zur Bestimmung des Molekulargewichtes als nicht förderlich.

SDS-PAGE, Western Blotting und Immunoblotdetektion wurden wiederholt. Diesmal wurden statt  $\beta$ -Mercaptoethanol 10 mM Iodacetamid bzw. 8 M Harnstoff zur Probenaufbereitung verwendet. Abb. 37 zeigt das Ergebnis.



**Abb. 37:** Spezifische AdrA-Signale bei 42 bzw. 17 kDa auf einem Western Blot: Die Proben wurden entweder mit 10 mM Iodacetamid oder 8 M Harnstoff behandelt.

**1:** *S. Typhimurium* MAE 103 (pWJB30); **2:** *S. Typhimurium* MAE 103 (pBAD30)

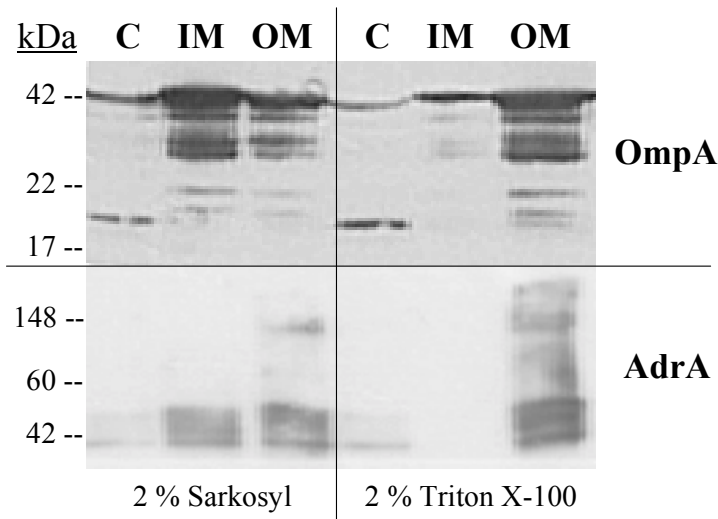
Wiederum zeigte sich, dass es entscheidend war, die Proben nicht aufzukochen, um ein Signal auf der richtigen Höhe zu erhalten. Die Wahl zwischen  $\beta$ -Mercaptoethanol, Iodacetamid oder Harnstoff war weniger entscheidend. Allerdings ergab der Aufschluss der Proben mit Harnstoff die schärfsten Banden und klarsten Signale. Auf Grund dieses Befundes sowie der Tatsache, dass mit Harnstoff aufgeschlossene Proben gut und verlustfrei in die Geltaschen zu pipettieren waren, wurde diese Methode des Zellaufschlusses für den AdrA-Nachweis beibehalten.

### III.2.3.2. Lokalisation des AdrA in der Zelle:

Laut Computerprogrammvorhersagen enthält das AdrA bis zu fünf N-terminale Transmembrandomänen und ist mit diesen höchstwahrscheinlich in der inneren Zellmembran verankert (RÖMLING ET AL., 2000). Um diesen Sachverhalt experimentell nachzuweisen, wurden Zellsuspensionen des Stammes MAE 103 (pWJB30) mittels einer Zellfraktionierung (s. Kapitel II.6.4.) in die drei Kompartimente äußere Zellmembranfraktion (OM), innere Zellmembranfraktion (IM) und zytosolische Fraktion (C) aufgetrennt. Dazu wurde die Methode der differentiellen Solubilisierung von Membranproteinen verwendet (LOFERER ET AL., 1997; MICHIELS ET AL., 1989; SCHNAITMAN 1981), da die Sucrosegradientenmethode (BECK & DOWNS 1999) bei Zellen, die von Platten isoliert werden, nach Erfahrungswerten (persönliche Mitteilung von Herrn H. Loferer) nicht funktioniert. Es wurden verschiedene starke Detergentien, Sarkosyl und Triton X-100, gewählt. Die Qualität der Auftrennung wurde zum einen im Western Blot via OmpA-Detektion (Outer membrane protein A) und zum anderen via NADH-Oxidase-Test bzw. Häminnachweis überprüft (s. Kapitel II.6.4.).

Wie sich jedoch zeigen sollte, funktionierten der NADH-Oxidase-Test in beiden Variationen sowie der Häminnachweis nicht einwandfrei. Offensichtlich wirkten die Detergentien, die zur Trennung beider Membranfraktionen voneinander verwendet wurden, hemmend auf die Enzymaktivität. Die NADH-Oxidase-Testvariationen funktionierten lediglich bei einfachen durch Ultraschall aufgeschlossenen Zellsuspensionen. Somit war kein Marker für die innere Zellmembran vorhanden. Die AdrA-Detektion erfolgte wie üblich auf dem Western Blot mittels  $\alpha$ -Tetra-His-Antikörper.

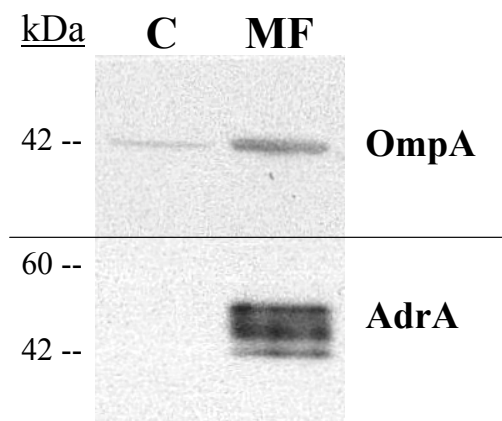




**Abb. 38:** OmpA- und AdrA-Detektion in zytosolischer Fraktion (C), innerer Membranfraktion (IM) und äußerer Membranfraktion (OM) zweier Zellfraktionierungen, bei denen unterschiedliche Detergenzien zur Trennung beider Membranfraktionen verwendet wurden: Erklärungen befinden sich im Text.

Wie aus Abb. 38 ersichtlich, hat die differentielle Solubilisierung der Proteine aus innerer und äußerer Membran nie hundertprozentig funktioniert. Die Auftrennung mit 2 % Triton X-100 schien jedoch deutlich besser gewesen zu sein als die Auftrennung mit 2 % Sarkosyl. Die Auftrennung mit 0,5 % Sarkosyl ergab ein ähnliches Bild wie das der Auftrennung mit 2 % Triton X-100. Da jedoch ein zuverlässiger Marker für die innere Membran fehlte, konnte über die tatsächliche Qualität der Auftrennung keine Aussage gemacht werden.

Beim Betrachten der Ergebnisse der AdrA-Detektion fällt auf, dass der Anteil an detektiertem AdrA in gewisser Weise mit dem der äußeren Zellmembran korreliert. Hierfür gibt es drei Erklärungsmöglichkeiten. Die erste Möglichkeit wäre, dass lediglich eine Auftrennung zwischen Gesamt-Membranfraktion und zytosolischer Fraktion stattgefunden hat. Als zweite Möglichkeit wäre in Betracht zu ziehen, dass das AdrA entgegen der Prognosen ein Protein der äußeren Zellmembran ist. Schließlich könnte das Auftreten des AdrA-Signals in der äußeren Membranfraktion darin begründet liegen, dass das AdrA generell so schwer in Lösung zu bringen ist, dass es sich zusammen mit den Bestandteilen der äußeren Membran in der OM-Fraktion absetzt, obwohl es Bestandteil der inneren Membran ist. Für diese Möglichkeit spricht die starke Hydrophobizität der N-terminalen Domäne.



**Abb. 39:** OmpA- und AdrA-Detektion in zytosolischer (C) und Gesamt-Membranfraktion (MF) einer Zellfraktionierung, bei der eine weitere Auftrennung der Gesamt-Membranfraktion in innere und äußere Membranfraktion durch Behandlung mit Detergenz unterblieb: OmpA- und AdrA-Signale traten so gut wie ausschließlich in der Gesamt-Membranfraktion auf.

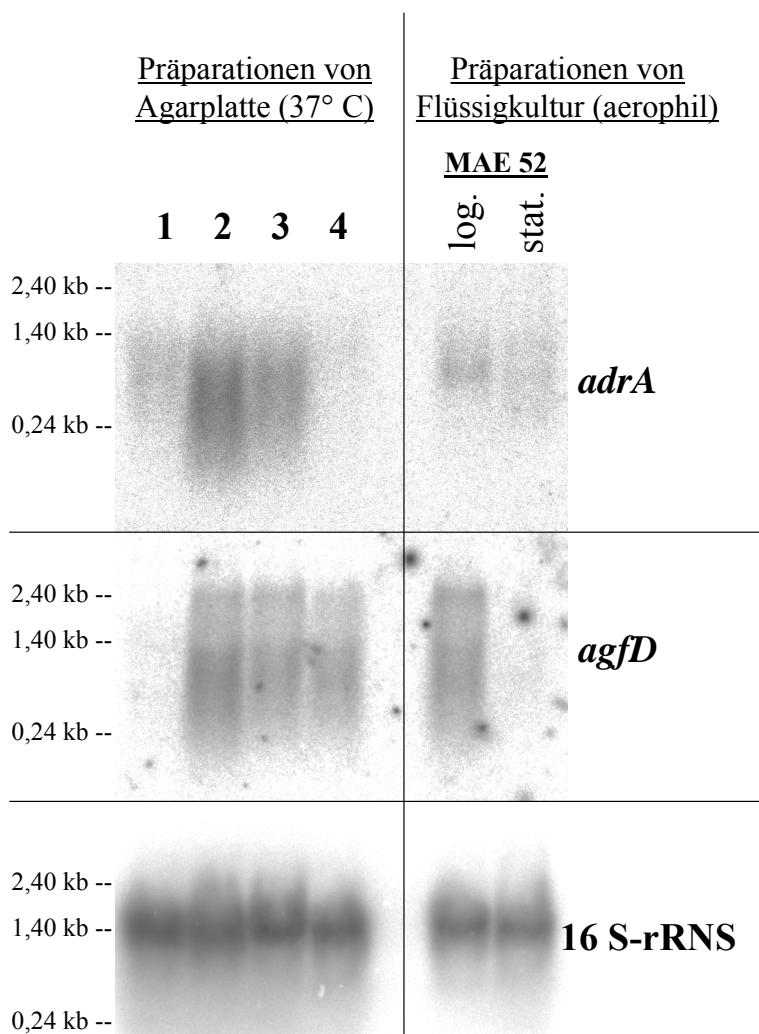
Anhand der Stärke der OmpA-Signale in den beiden Membranfraktionen im Vergleich zu der in der zytosolischen Fraktion ist eindeutig zu erkennen, dass zumindest die Auftrennung in zytosolische Fraktion und Gesamt-Membranfraktion in jedem Fall recht gut funktioniert hat. Da das AdrA-Signal fast ausschließlich in den Membranfraktionen auftrat, war somit der Nachweis erbracht, dass es sich beim AdrA um ein Membranprotein handelt. Dieser Befund wurde durch entsprechende Resultate aus Zellfraktionierungen, bei denen keine weitere

Auftrennung der Gesamt-Membranfraktion in innere und äußere Membranfraktion erfolgt war, unterstützt (s. Abb. 39). So waren OmpA- und AdrA-Signale hier nur in der Gesamt-Membranfraktion und nicht in der zytosolischen Fraktion nachweisbar.

### III.2.4. Untersuchungen zur Transkription des *adrA*:

#### III.2.4.1. Wie groß ist das primäre Transkript des *adrA*?

Diese Frage sollte anhand von RNS-Studien geklärt werden. Hierzu wurde von den auf einer Agarplatte angezogenen Stämmen MAE 51 (UMR 1 *PagfD2 ΔagfD101*), MAE 52 (UMR 1 *PagfD1*), MAE 97 (MAE 52 *ΔagfBA102*) und MAE 229 (MAE 52 *ΔadrA*) sowie von einer unter aerophilen Bedingungen bei 37° C und 210 rpm angezogenen Flüssigkultur mit vorgeschalteter Vorkultur (s. Kapitel II.5.4.2.1.) des Stammes MAE 52 aus logarithmischer und stationärer Phase nach Gesamt-RNS isoliert und ein Northern Blot hergestellt. Dieser Blot wurde nacheinander mit einer radioaktiv markierten *adrA*-, *agfD*- und 16 S-rRNS-Sonde hybridisiert.



**Abb. 40:** *adrA*-mRNS-, *agfD*-mRNS- und 16 S-rRNS-Signale auf einem Northern Blot:

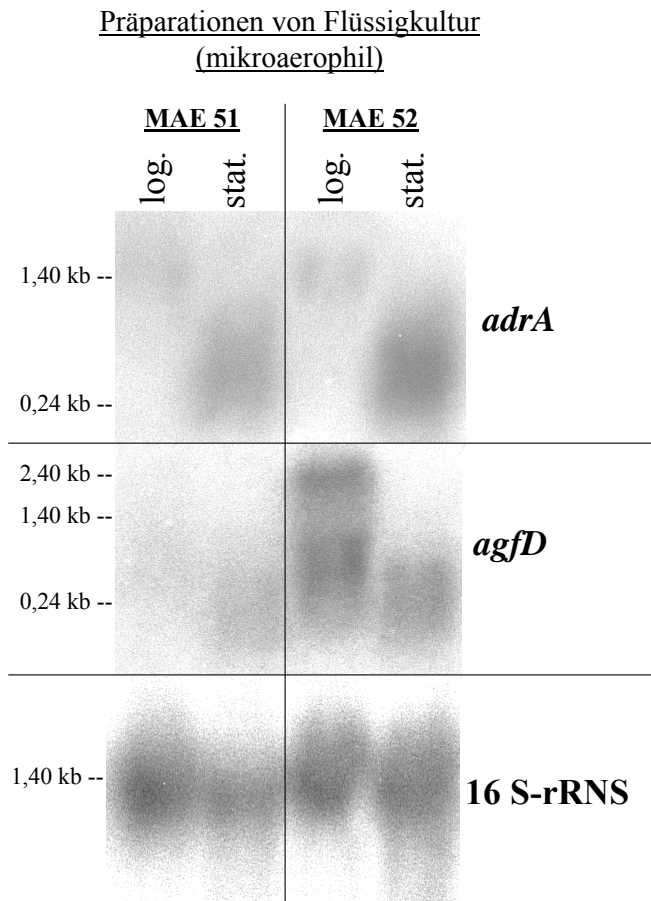
**1:** *S. Typhimurium* MAE 51; **2:** *S. Typhimurium* MAE 52; **3:** *S. Typhimurium* MAE 97; **4:** *S. Typhimurium* MAE 229; Erläuterungen zu den Stämmen befinden sich im Text; logarithmische Phase (log.): O.D.<sub>600 nm</sub> von 0,3 - 0,4 nach etwa 2,5 h Inkubation; stationäre Phase (stat.): O.D.<sub>600 nm</sub> von 3 nach etwa 20 h Inkubation

Wie aus Abb. 40 ersichtlich, lag die Größe des *adrA*-Signales bei etwa 1,4 kb. Dieser Wert entspricht also der ungefähren Größe des primären Transkriptes. Dieser Befund deutet darauf hin, dass das *adrA* mit einem ORF von 1,1 kb wahrscheinlich alleine transkribiert wird und nicht zusammen mit dem stromaufwärts gelegenen *psiF*-Gen Bestandteil eines Operons ist.



Interessanterweise zeigte die *agfD*-Negativmutante MAE 51 ebenfalls ein schwaches *adrA*-Signal. Offensichtlich findet auch ohne den Einfluss von AgfD eine schwache *adrA*-Transkription statt. Die *adrA*-Deletionsmutante MAE 229 zeigte erwartungsgemäß so gut wie kein *adrA*-Signal.

Die *agfD*-Signale waren bei allen Stämmen mit Ausnahme der *agfD*-Negativmutante MAE 51 ungefähr gleich stark. Sie zeigten darüber hinaus das für das *agfD*-Transkript typische Muster (vgl. RÖMLING ET AL., 1998A).



**Abb. 41:** *adrA*-mRNS-, *agfD*-mRNS- und 16 S-rRNS-Signale der *S. Typhimurium*-Stämme MAE 51 und MAE 52 auf einem Northern Blot aus unter mikroaerophilen Bedingungen angezogenen Flüssigkulturen: logarithmische Phase (log.): O.D.<sub>600 nm</sub> von 0,4 nach etwa 4 h Inkubation; stationäre Phase (stat.): O.D.<sub>600 nm</sub> von 4 – 5 nach etwa 20 h Inkubation

Die ungefähr gleiche Stärke der 16 S-rRNS-Signale war der Nachweis dafür, dass die Konzentration der Gesamt-RNS in allen Proben in etwa gleich war. Somit beruhte die unterschiedliche Stärke der anderen Signale wirklich auf Unterschieden in der Transkriptionsrate.

Die Ergebnisse aus der Flüssigkultur waren insofern interessant, als sie gegensätzlich zu den bereits bekannten Sachverhalten stehen. So wird das *agfD* normalerweise erst in der späten logarithmischen und stationären Phase transkribiert (GERSTEL & RÖMLING 2001). Der Blot zeigte allerdings ein starkes *agfD*-Signal in der logarithmischen Phase und so gut wie kein Signal in der stationären Phase. Ähnliches galt für die *adrA*-Signale. Auch hier war das Signal in der logarithmischen Phase stärker als in der stationären Phase. Die Konzentrationen an Gesamt-RNS war in beiden Proben etwa gleich und schieden somit als Erklärung für dieses Ergebnis aus. Wiederholungen des Experimentes brachten die gleichen Resultate.

Der *agfD*-Promotor des Stammes MAE 52 ist hochreguliert und unter aerophilen Bedingungen bei 37° C aktiv. Ein Aktivitätsmaximum hat dieser Promoter jedoch unter mikroaerophilen Bedingungen (GERSTEL & RÖMLING 2001). Diese Ergebnisse wurden von Herrn U. Gerstel im Verlauf dieser Untersuchungen erhalten. Aus diesem Grund wurde das Experiment einmal unter mikroaerophilen Bedingungen bei 28° C und 150 rpm durchgeführt, um zu sehen, ob die entsprechenden Resultate sich von denen unter aerophilen Bedingungen erhaltenen

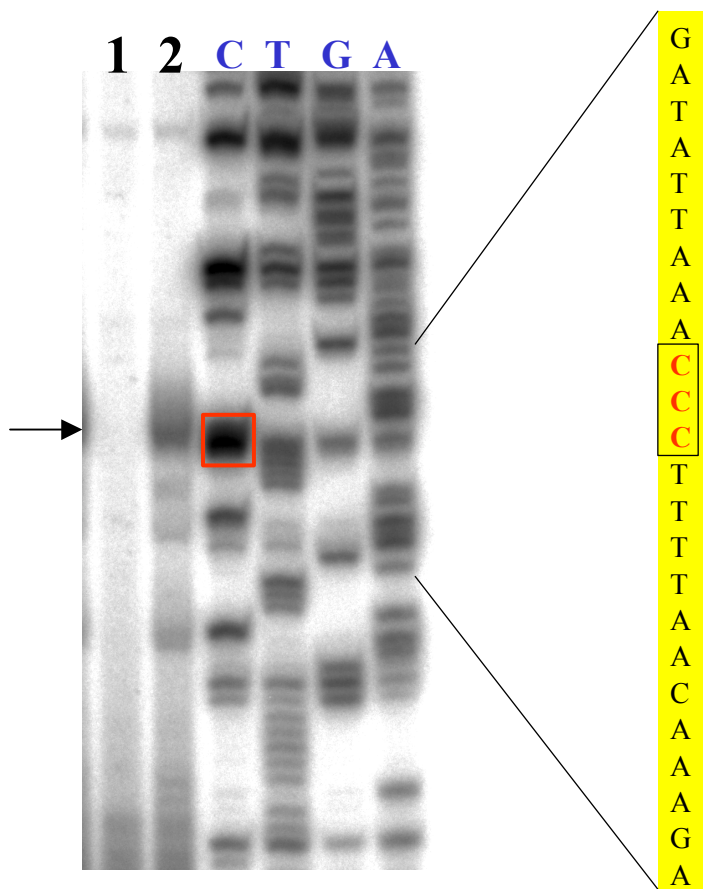
Ergebnissen unterscheiden. Zusätzlich zum Stamm MAE 52 wurde diesmal auch der Stamm MAE 51 getestet.

Abb. 41 zeigt, dass das *adrA*-Signal diesmal in der stationären Phase deutlich stärker war als in der logarithmischen Phase. Bemerkenswert ist, dass der Stamm MAE 51 ein nahezu ebenso starkes Signal zeigte wie der Stamm MAE 52. Ein *agfD*-Signal trat beim Stamm MAE 51 jedoch erwartungsgemäß nicht auf. Die schwachen Signale des Stammes MAE 51, die dennoch nach Inkubation des Blots mit der *agfD*-Sonde festzustellen waren, sind auf restliche *adrA*-Signale zurückzuführen.

Der Stamm MAE 52 zeigte wieder ausschließlich in der logarithmischen Phase ein starkes *agfD*-Signal. Auch hier entspricht das Signal aus der stationären Phase einem *adrA*-Restsignal. Da die Konzentrationen an Gesamt-RNS wieder bei allen Proben ungefähr gleich waren, konnten die Unstimmigkeiten wiederum nicht mit einer zu schwachen oder zu starken RNS-Konzentration erklärt werden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Ergebnisse bezüglich der Transkription des *agfD*-Genes, welche auf der Basis einer Promotorfusion mit dem *lacZ*-Gen und anschließender Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität beruhen, von den Ergebnissen der mRNA-Bestimmung durch Northern-Blot-Analyse abweichen.

### III.2.4.2. Wo liegt der Transkriptionsstart des *adrA*?

Die ungefähre Größe des primären Transkriptes des *adrA*-Gens wurde mit etwa 1,4 kb ermittelt. Der für die Translation relevante Leserahmen beträgt 1,1 kb. Somit sollte der Transkriptionsstartpunkt maximal 300 Basen vor dem Translationsstart gelegen sein.



**Abb. 42:** Primer Extension-Gel: 1: *S. Typhimurium* MAE 51; 2: *S. Typhimurium* MAE 52; C, T, G, A: die entsprechenden Sequenzleitern; verwendeter Primer: PRIMEX-3: Der Pfeil deutet auf das spezifische Signal, welches nur beim Stamm MAE 52 auftritt. Die Sequenz des entsprechenden DNS-Abschnittes ist anhand der vier Sequenzleitern zu erkennen. Die drei möglichen Transkriptionsstartpunkte sind in rot dargestellt (vgl. rotes Kästchen in der C-Leiter).

Zum Ermitteln des Transkriptionsstartpunktes wurden vier Primer konstruiert, die mit PRIMEX-1 bis 4 (s. Kapitel II.8.1.5.2.) bezeichnet wurden und mit ungefähr 60 Basen Abstand voneinander in der Nähe des vermuteten Transkriptionsstartpunktes lagen. Mit diesen Primern

wurde Primer Extension (s. Kapitel II.8.2.4.) durchgeführt, wobei jeweils 30 µg Gesamt-RNS der Stämme MAE 51 und MAE 52 als Matrize dienten. Beide Stämme wurden zuvor auf einer LB-ohne-Salz-Agarplatte bei 37° C für 24 h angezogen. Die Isolierung der Gesamt-RNS erfolgte nach der in Kapitel II.8.2.1.1. beschriebenen Methode. Als DNS-Matrize zur Herstellung der vier Sequenzleitern diente das Vektorkonstrukt pWJB4, welches ein kurzes vorderes Teilstück des *adrA* sowie etwa 500 Basen stromauf angrenzender DNS enthielt. Abb. 42 zeigt das Ergebnis.

Von den vier Primern PRIMEX-1 bis 4 ergab lediglich PRIMEX-3 ein brauchbares spezifisches Signal, welches nur beim Stamm MAE 52 auftrat. Die Position dieses Signales innerhalb der entsprechenden DNS-Sequenz konnte ermittelt werden. Sie lag innerhalb eines Bereiches von drei Cytosinen (s. Pfeil bzw. rotes Kästchen in Abb. 42), die im Abstand von nur 14 Basen vor dem Translationsstart liegen. Zwar sind in Abb. 42 noch einige weitere spezifische Banden zu erkennen. Diese scheiden jedoch als Transkriptionsstartpunkte aus, da sie allesamt kürzer und deutlich schwächer sind als das Hauptsignal. Es handelt sich somit bei diesen Signalen höchstwahrscheinlich um verkürzte Elongationsprodukte. Das schwache Signal, welches sich im Bild ganz oben befindet, tritt bei beiden Stämmen gleichermaßen auf und ist somit unspezifisch. Es stellt höchstwahrscheinlich ein Produkt dar, das durch eine Fehlpaarung des Primers an unspezifischer Stelle auf der DNS-Matrize entstanden ist. Welches der drei auf Höhe des spezifischen Hauptsignales gelegenen Cytosine den Transkriptionsstartpunkt darstellt, konnte nicht genau bestimmt werden, da das Signal relativ breitbandig war. Möglicherweise fungieren alle drei Cytosine im Wechsel als Startpunkt der Transkription. Dies könnte die Breitbandigkeit des Signals erklären. Der Höhe des Signals nach scheint das mittlere der drei Cytosine den Haupttranskriptionsstartpunkt darzustellen.

### III.2.4.3. Die Promotorregion des *adrA*:

Nachdem der Transkriptionsstartpunkt des *adrA* identifiziert worden war, konnte nun die Promotorregion dieses Gens näher betrachtet werden. Diese ist in Abb. 43 gezeigt. Gleichzeitig wurde ein Vergleich mit den entsprechenden Regionen anderer Spezies angestellt, deren Sequenzen wiederum von der Internetseite des Sanger Centers UK bezogen wurden.

						<b>-35</b>	
S.Tm.	<b>UMR 1/LT 2</b>	GTGAGTCCTG	AAAAACACTC	ACCCGAAATT	TC <b>CATACT</b> TCC	TCCATGCGCT	
S.T.	<b>CT 18</b>	GTGAG <b>CC</b> CTG	AAAAACACTC	ACCCGAAATT	TC <b>CATACT</b> CCC	TCCATGCGCT	
S.Pt.	<b>A</b>	GTGAG <b>CC</b> CTG	AAAAACACTC	ACCCGAAATT	TC <b>CATACT</b> TCC	TCCATGCGCT	
<i>E.c.</i>	<b>K 12</b>	GTGAG <b>CTACG</b>	AAAAT <b>TGG</b> CTC	ACCCGAAATA	TC <b>CATACT</b> TCT	<b>GCCTTTAGCT</b>	
<i>E.c.</i>	<b>O157:H7</b>	GTGAG <b>CTACT</b>	AAAAT <b>TGG</b> CTC	ACCCGAAATT	TC <b>CATACT</b> TCT	<b>GCCTTTAGCC</b>	
	<b>Konsensus</b>				<b>TTGACA</b>		
			<b>-10</b>	<b>+1</b>		<b>Start <i>adrA</i></b>	
S.Tm.	<b>UMR 1/LT 2</b>	CTGTTTCTAT	AATTT <b>GGG</b> AA	AATTGTTTCT	AAATGTTCCC	AAAAATAATG	
S.T.	<b>CT 18</b>	CTGTTTCTAT	AATTT <b>GGG</b> AA	AATTGTTTCT	AAATGTTCCC	AAAAATAATG	
S.Pt.	<b>A</b>	CTGTTTCTAT	AATTT <b>GGG</b> AA	AATTGTTTCT	AAATGTTCCC	AAAAATAATG	
<i>E.c.</i>	<b>K 12</b>	CCGT <b>CT</b> CTAT	AATTT <b>GGG</b> AA	AATTGTTTCT	<b>GAATGTTCCC</b>	AAAAATAATG	
<i>E.c.</i>	<b>O157:H7</b>	CCGT <b>CT</b> CTAT	AATTT <b>GGG</b> AA	AATTGTTTCT	<b>GAATGTTCCC</b>	AAAAATAATG	
	<b>Konsensus</b>	<b>TAT AAT</b>					

**Abb. 43:** Promotorregionen des *adrA*-Gens verschiedener Spezies: Die vermuteten -10- und -35-Regionen mit Konsensussequenz sind eingezeichnet, ebenso der Transkriptionsstart. Mutationen gegenüber der UMR 1-Sequenz sind in fett dargestellt. S.Tm. = *S. Typhimurium*; S.T. = *S. Typhi*; S.Pt. = *S. Paratyphi*; *E.c.* = *E. coli*

Wie aus Abb. 43 ersichtlich ist der Abschnitt zwischen Transkriptions- und Translationsstart beim *adrA* mit 14 Basen sehr kurz. Somit ist unwahrscheinlich, dass sich nach erfolgter Transkription innerhalb dieses Sequenzabschnittes Sekundärstrukturen ausbilden können, die

die Stabilität der mRNA erhöhen. Dies erklärt möglicherweise den Schmier im *adrA*-Signal der Northern Blots, der auf zügigen Abbau der mRNA hindeutet.

Desweiteren ist auffällig, dass die vermutliche –10-Region praktisch unmittelbar vor dem Transkriptionsstartpunkt gelegen ist. Es gibt zwei Gründe, die dafür sprechen, dass es sich bei diesem DNS-Abschnitt tatsächlich um die –10-Region handelt. Zum einen entspricht dieser Sequenzabschnitt der Konsensussequenz für die –10-Region und zum anderen liegt er in einem hochkonservierten Bereich, welcher bei allen überprüften Spezies gleich ist. Letzteres trifft ebenfalls auf die vermutliche –35-Region zu. Allerdings besteht hier gegenüber der Konsensussequenz nur eine geringe Übereinstimmung. Lediglich das Adenin und das Cytosin an vierter bzw. fünfter Stelle sind identisch. Zusätzlich gibt es jedoch Positionen, an denen Basen der Konsensussequenz durch homologe Basen ersetzt sind, nämlich an zweiter und sechster Stelle der vermuteten –35-Region.

Der DNS-Abschnitt zwischen vermutlicher –10- und vermutlicher –35-Region ist mit 20 Basen ungewöhnlich groß. Es bedarf daher noch einer experimentellen Bestätigung, dass die beiden entsprechenden DNS-Abschnitte tatsächlich der –35- bzw. -10-Region zuzuordnen sind.

### III.2.4.4. Vergleich der *agfB*-Promotorsequenz mit der des *adrA*-Promotors:

Sowohl das *agfB*- als auch das *adrA*-Gen sind zu 100 % abhängig von AgfD. Somit ist zu erwarten, dass die Promotorregionen beider Gene gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen. Im Folgenden sind daher beide Promotorregionen des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1 einander gegenübergestellt, um diese These zu überprüfen.

<b><i>agfB</i>-Promotor</b>	TTTATTAGCA	CTTTGGTATG	AGCTTAAATA	ACAAAATACC	ACGCGTGCGT
<b><i>adrA</i>-Promotor</b>	AAAAGCGGCG	TAGTGCTATC	GGTGAGTCC	TGAAAAACAC	TCACCCGAAA
	<b>-35</b>		<b>-10</b>	<b>+1</b>	
<b><i>agfB</i>-Promotor</b>	GAGTTATTAA	AAATGTTTCC	ACGGACATAC	TCTTCATCGT	AACGACGCGT
<b><i>adrA</i>-Promotor</b>	TTTCATACTT	CCTCCATGCG	CTCTGTTTCT	ATAATTTGGG	AAAATTGTTT
<b><i>agfB</i>-Promotor</b>	TAACAAAAAA	CGCATGTCGC	TAACAAGGTA	ATAGATAATT	TTCGCTATGT
<b><i>adrA</i>-Promotor</b>	CTAAATGTTC	CCAAAAATAA	TGAATGATGA	AAATTTTAC	CGAAAAGCGG
	<b>Start <i>adrA</i></b>				
	<b>Start <i>agfB</i></b>				
<b><i>agfB</i>-Promotor</b>	ACGACCAGGT	CCAGGGTGAC	AGCATGAAAA	ACAAATTGTT	ATTTATGATG
<b><i>adrA</i>-Promotor</b>	TTGAACAGGC	GGTAGCGCCG	CCTGACCCTC	CTGATGATCG	TCAGCGCTCC

**Abb. 44:** Gegenüberstellung der Promotorregionen von *adrA* und *agfB* des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1: Übereinstimmende Bereiche sind grau unterlegt. –35-Region, –10-Region und Transkriptionsstartpunkte beider Gene sind eingezeichnet. Die jeweiligen Startcodons der Leserahmen sind unterstrichen.

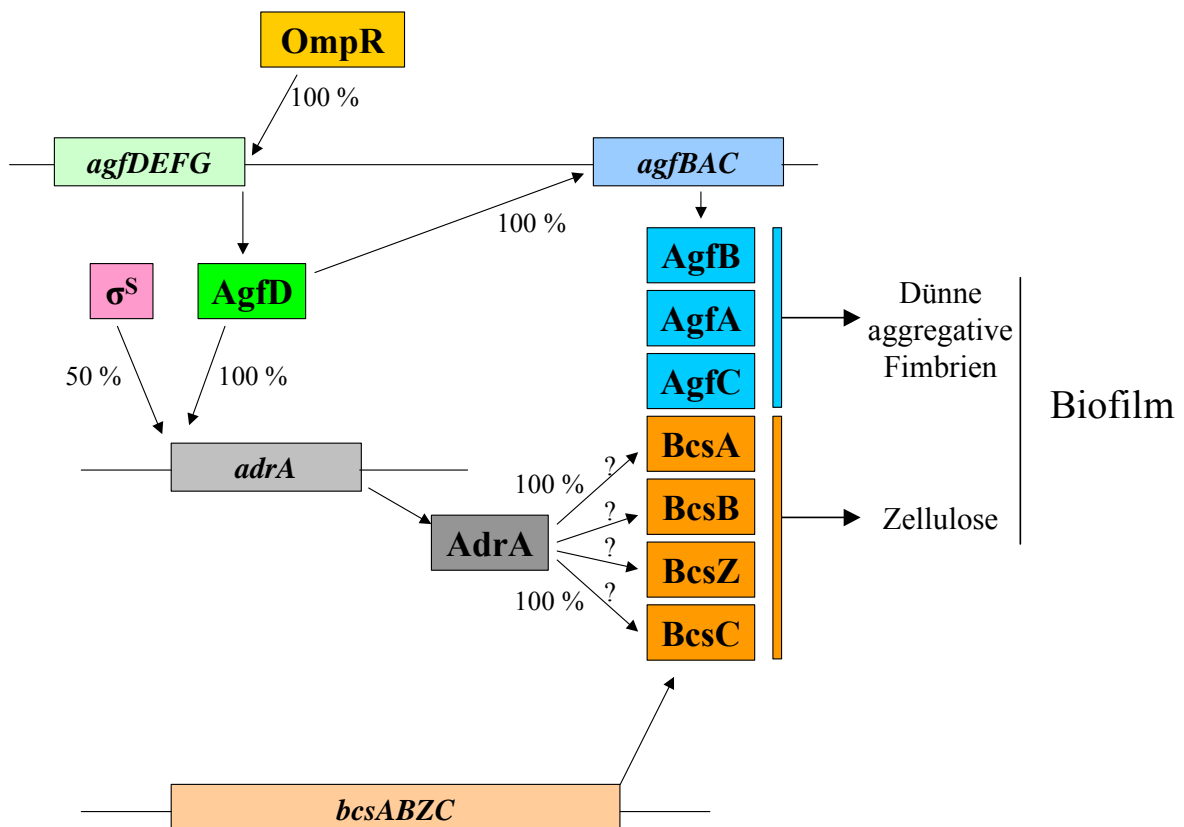
Der Vergleich beider Promotorregionen zeigt, dass so gut wie keine Übereinstimmungen zwischen *adrA*- und *agfB*-Promotor vorliegen. Lediglich die beiden grau unterlegten Bereiche sind identisch und liegen in gleichem Abstand zum Transkriptionsstartpunkt. Bezogen auf –35- und –10-Region liegen sie allerdings an unterschiedlichen Stellen, da diese Regionen zueinander versetzt sind. Trotzdem könnten die beiden Bereiche Bestandteil einer AgfD-Bindungsstelle sein. Diese Hypothese bedarf allerdings noch der experimentellen Bestätigung.

Interessanterweise sind die Spacer-Regionen zwischen –35- und –10-Region mit 19 Basen im Falle des *agfB*- und 20 Basen im Falle des *adrA*-Promotors größer als im Standardpromotor mit 17 bp. Allerdings sind in der –10-Region des *agfB*-Promotors im Gegensatz zu der des *adrA*-Promotors zwei Abweichungen von der Konsensussequenz an erster und fünfter Stelle vorhanden.

Die –35-Regionen zeigen bei beiden Genen lediglich an zwei Stellen Übereinstimmung mit der Konsensussequenz, jedoch an unterschiedlicher Stelle. In der –35-Region des *agfB*-Promotors liegen diese an der dritten bei *E. coli*-Promotoren hochkonservierten Position (WALKER ET AL., 1998) und sechster Stelle, in der des *adrA*-Promotors an vierter und fünfter Stelle. Bei beiden –35-Regionen liegen zusätzlich zwei homologe Basenaustausche verglichen mit der Konsensussequenz vor. Das Thymin an zweiter Position ist bei den –35-Regionen beider Promotoren gegen ein Adenin ausgetauscht. Der zweite homologe Basenaustausch liegt beim *agfB*-Promotor an dritter beim *adrA*-Promotor an sechster Stelle.

### III.2.5. Die gesamte zur Biofilmbildung führende Regulationskaskade:

In Abb. 45 ist die Regulationskaskade, die zumindest beim *S. Typhimurium*-Stamm MAE 52 letztendlich zur Bildung dünner aggregativer Fimbrien und Zellulose führt, noch einmal dargestellt.



**Abb. 45:** Schema der zur Biofilmbildung führenden Regulationskaskade bei *S. Typhimurium* MAE 52: Erklärungen zu den einzelnen Komponenten der Kaskade befinden sich im Text.

OmpR aktiviert in der stationären Wachstumsphase unter biofilmbildenden Inkubationsbedingungen den *agfDEFG*-Promotor, was zur Transkription und Translation des *agfD* und somit zur Produktion des Regulators AgfD führt. AgfD bindet an den *agfBAC*- und den *adrA*-Promotor, was bewirkt, dass dünne aggregative Fimbrien und AdrA exprimiert werden. Das *adrA*-Gen ist darüber hinaus zu 50 – 100 % abhängig von  $\sigma^S$  (vgl. Tab. 20). Das AdrA schließlich interagiert mit einem oder mehreren Produkten des *bcsABZC*-Operons, was zur Bildung von Zellulose führt.

Das Schema zeigt, wie die Regulationskaskade beim Stamm MAE 52 funktioniert. Bei anderen Stämmen gibt es einige Abweichungen. So hat der *S. Typhimurium*-Stamm UMR 1 im

Gegensatz zu MAE 52 einen  $\sigma^S$ - und temperaturabhängigen *agfD*-Promotor (RÖMLING ET AL., 1998A und 1998B). Wahrscheinlich blockiert hier ein Inhibitor bei 37° C die OmpR-Bindungsstelle (s. Kapitel III.1.6.3.2.). Darüber hinaus scheint das *agfD* auch bei vielen *S. Typhimurium*-Wildtypstämmen  $\sigma^S$ -abhängig zu sein (s. Kapitel III.1.6.2.).



## IV. Diskussion:

In dieser Arbeit wurde die Phänotypdiversität von verschiedenen *Salmonella*- und *E. coli*-Wildtypstämmen in Bezug auf den rdar-Morphotyp hin untersucht. Hierfür wurden frische Isolate ebenso wie Stämme aus Stammsammlungen berücksichtigt. Der rdar-Morphotyp exprimiert die extrazellulären Matrixkomponenten dünne aggregative Fimbrien und Zellulose, deren Expression auf Agarplatten mit dem Farbstoff Kongorot durch die Ausprägung spezifischer Morphotypen leicht nachgewiesen werden kann. Die Kultivierungsexperimente wurden mit molekularen Studien zur Expression der Zellulose sowie der dünnen aggregativen Fimbrien korreliert. Da zumindest dünne aggregative Fimbrien als Virulenzfaktoren angesehen werden (BIAN ET AL., 2000 und 2001), wurden die entsprechenden Ergebnisse von kommensalen und uropathogenen *E. coli*-Stämmen bzw. die Ergebnisse von *Salmonella*-Stämmen mit hoher und geringer Wirtsspezifität jeweils miteinander verglichen. Ferner wurden Ergebnisse frisch isolierter *E. coli*-Stämme denen der entsprechenden Stämme aus Stammsammlungen gegenübergestellt, um die Variabilität des rdar-Morphotyps unter Laborbedingungen zu überprüfen.

Neben den vom *S. Typhimurium*-Stamm ATCC14028 her bekannten vier Phänotypen rdar (Produktion dünner aggregativer Fimbrien und Zellulose), bdar (lediglich Produktion dünner aggregativer Fimbrien), pdar (lediglich Zelluloseproduktion) und saw (keine Biofilmbildung) traten sowohl bei den *E. coli*- als auch bei den *Salmonella*-Stämmen zahlreiche Übergangsformen dieser Phänotypen auf. Insgesamt gesehen konnte bei *E. coli* gegenüber *Salmonella* eine größere Vielfalt an diesen Übergangsphänotypen festgestellt werden. Der Phänotyp bdar fehlte bei den *Salmonella*-Stämmen völlig.

Vertreter anderer Spezies, die neben den kommensalen *E. coli*-Stämmen ebenfalls aus Stuhlproben isoliert worden waren, zeigten ähnliche Phänotypen, wie sie bei *E. coli*- und *Salmonella* vorkommen.

Sowohl bei *E. coli*- als auch bei *Salmonella*-Wildtypstämmen wurden analog zum *S. Typhimurium*-Stamm ATCC14028 AgfA und Zellulose als Hauptkomponenten der Biofilmbildung nachgewiesen. Der Grad an AgfA- und Zelluloseexpression korrelierte weitgehend mit den entsprechenden CR- und CF-Phänotypen der jeweiligen Stämme.

Die *Salmonella*-Stämme wurden anhand ihres Serotyps in die beiden Stammgruppen „Hohe Wirtsspezifität“ und „Geringe Wirtsspezifität“ eingeteilt. Wie sich zeigte, überwogen bei den Vertretern der Gruppe mit hoher Wirtsspezifität, bestehend aus diversen *S. Typhi*-, *S. Typhimurium* var. Copenhagen-, *S. Gallinarum*- und *S. Choleraesuis*-Stämmen, bei 28° C und 37° C deutlich die Phänotypen, die weder dünne aggregative Fimbrien noch Zellulose exprimierten. Eine Ausnahme innerhalb dieser Gruppe stellten *S. Gallinarum*-Stämme dar, die Zellulose hauptsächlich bei 37° C produzierten. Bei den Vertretern der Gruppe mit geringer Wirtsspezifität, die sich aus zahlreichen *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis*-Stämmen zusammensetzte, dominierten deutlich die Stämme, die bei 28° C beide und bei 37° C keine der beiden Biofilmkomponenten produzierten.

Die durchschnittliche Anzahl an verschiedenen Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Abstrichprobe war bei frisch isolierten uropathogenen und kommensalen *E. coli*-Stämmen gleich. Dasselbe galt für uropathogene und fäkale *E. coli*-Stämme sowie für pathogene *S. Typhimurium*-Stämme aus den sogenannten EcoR- (OCHMAN & SELANDER 1984) und LT-Sammlung (LILLENGEN 1948), bei denen trotz angenommener ursprünglicher Vereinzelung nach langer Lagerung eine Phänotypdiversität innerhalb einer Kultur nachzuweisen war.

Die Phänotypdiversität der frischen *E. coli*-Isolate war bei den Fäkalstämmen deutlich höher als bei den uropathogenen Stämmen. Darüber hinaus war der Anteil an Stämmen mit dem Phänotyp pdar (Zelluloseproduktion) sowohl bei 28° C als auch bei 37° C bei den uropathogenen Stämmen stärker vertreten als bei den kommensalen Stämmen. Der Phänotyp bdar (Produktion dünner aggregativer Fimbrien) trat bei beiden Gruppen etwa gleichhäufig auf,

wohingegen der Phänotyp *rdar* (Produktion dünner aggregativer Fimbrien und Zellulose) bei den uropathogenen Stämmen im Gegensatz zu den Fäkalstämmen bei 37° C eher selten war. Bei der Gegenüberstellung der Verteilung von *AgfA*- bzw. zelluloseproduzierenden Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) waren jedoch keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen.

Anders sah dies bei den Vertretern von *EcoR*- und *LT*-Sammlung aus. Hier bestand eine gewisse Abhängigkeit des Ausprägungsgrades der beiden Komponenten *AgfA* und Zellulose von der Pathogenität der jeweiligen Stammgruppe. So produzierten 95 % der *LT*-Stämme bei 37° C kein *AgfA*. Bei den uropathogenen *EcoR*-Stämmen waren dies immerhin 55 % und bei den Fäkalstämmen lediglich 30 %. Nahezu 100 % der *LT*-Stämme exprimierten bei 37° C keine Zellulose. Bei den uropathogenen und kommensalen *EcoR*-Stämmen waren dies jeweils etwas über 80 %. Diese Ergebnisse sind jedoch etwas mit Vorsicht zu bewerten, da der biofilmbildende Phänotyp instabil ist und die Lagerungsbedingungen der Bakterienstämme sicher einen Einfluss auf die Ausprägung des biofilmbildenden Phänotyps hatten.

Insgesamt gesehen war bei *E. coli* kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen bezüglich des *AgfA*- und Zelluloseproduktionsgrades frischer Isolate und denen der Stämme aus den beiden Stammsammlungen festzustellen.

Eisenmangelbedingungen riefen bei *Salmonella* serotypspezifische Antworten hervor. Bei *S. Enteritidis* hatte der Eisenmangel keine Auswirkungen auf die Phänotypausprägung. Die *S. Typhimurium*-Stämme reagierten mit einer erhöhten *AgfA*-, die *S. Typhimurium* var. *Copenhagen*-Stämme mit erhöhter Zelluloseproduktion auf den Eisenmangel.

Das *AgfA* zweier *E. coli*-Stämme zeigte im SDS-Gel ein abnormes Laufverhalten. Die genetische Analyse ergab, dass dieses abnorme Laufverhalten nicht mit einer Größenänderung der entsprechenden Proteine bedingt durch eine Insertion, Deletion oder eine Leserasterverschiebung erklärt werden konnte. Das *AgfA* dieser Stämme unterschied sich jedoch in einzelnen Aminosäuren vom *AgfA* des *E. coli*-Stammes K-12. Inwieweit individuelle Aminosäuresubstitutionen sich auf das Laufverhalten auswirken bleibt zu klären.

Von den frisch isolierten *E. coli*-Stämmen wurde der Serotyp bestimmt. Eine Korrelation zwischen Phänotyp und Serotyp wurde nicht gefunden. Stämme mit einem Serotyp, der sowohl bei uropathogenen als auch bei kommensalen Stämmen auftrat, wiesen unterschiedliche Phänotypen auf.

Bei nahezu allen *E. coli*- und *Salmonella*-Stämmen wurde untersucht, ob die Stämme prototroph oder auxotroph waren. Zusätzlich wurden bei zahlreichen *Salmonella*-Stämmen Untersuchungen bezüglich ihrer Motilität durchgeführt. Es bestand offensichtlich kein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Prototrophie bzw. Phänotyp und Motilität. Allerdings war eine gewisse Korrelation zwischen Serotyp und Prototrophie bzw. Serotyp und Motilität festzustellen. So waren nahezu alle *S. Typhi*-Stämme auxotroph. Darüber hinaus waren alle *S. Typhi*- sowie die deutliche Mehrzahl der *S. Choleraesuis*-Stämme mehr oder weniger nicht motil.

Um zu überprüfen, ob bei ausgewählten *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis*-Wildtypstämmen Unterschiede innerhalb der Regulationskaskade, die letztendlich zur Ausbildung eines Biofilms führt, zu der des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028-1s (UMR 1) bestehen, wurden in den Wildtypstämmen bestimmte Schlüsselgene gezielt ausgeschaltet und die Änderungen im Phänotyp dokumentiert. Bei allen getesteten *S. Typhimurium*-Wildtypstämmen war - wie im UMR1 (RÖMLING ET AL., 1998A und 1998B) - *agfD* abhängig von  $\sigma^S$ . Bei den *S. Enteritidis*-Stämmen war eine gewisse Unabhängigkeit der Expression der dünnen aggregativen Fimbrien von *rpoS* festzustellen. Analog zu *rpoS*-Negativmutanten des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028 hatte ein defektes *rpoS*-Gen bei den Wildtypstämmen eine verminderte Zelluloseproduktion zur Folge. Die Ausnahme war ein *S. Enteritidis*-Stamm, der eine gewisse Unabhängigkeit des *agfD* von *rpoS* sowie eine Entkopplung der Zelluloseproduktion von *adrA* zeigte.



Bei Serotypen, die den *rdar*-Morphotyp nicht exprimierten, sowie bei sich im Phänotyp unterscheidenden Stammpaaren wurde der Frage nachgegangen, welche Mutationen diese Phänotypänderungen bedingen. Sequenzierungen der intergenischen Region zwischen *agfDEFG*- und *agfBAC*-Operon deckten bei zahlreichen *Salmonella*-Stämmen verschiedene Punktmutationen in Form von Basenaustauschen auf. Eine Mutation an Position –33 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des *agfD* scheint bei den entsprechenden Stämmen allgemein biofilmbildungshemmend, eine Mutation an Position –44 biofilmbildungsfördernd (vgl. RÖMLING ET AL., 1998B) zu wirken.

Die *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme zeigten alle einen saw/saw-Gesamt-Phänotyp (28° C/37° C). Deshalb wurde die Promotorregion des *agfD* sowie das *agfD*-Gen selbst mittels Sequenzierung auf Mutationen hin untersucht, die den *agfD*-Promotor beeinträchtigen oder das AgfD in ein nicht funktionelles Protein verwandeln. Anhand einer spezifischen Punktmutation innerhalb des *agfE* bzw. einer spezifischen Mutation im *agfD*-Promotor konnten zwei Stammfamilien identifiziert werden, denen jeweils fünf Stämme angehörten. Jedoch konnten diese Stammfamilien weder einem bestimmten Isolierungsjahr noch einem bestimmten Isolierungsort zugeordnet werden. Ob die entsprechenden Mutationen die *agfD*-Expression und somit den biofilmbildenden Phänotyp beeinflussen, bleibt zu klären. Festzuhalten ist lediglich, dass die Mutation an Position –33 des *agfD*-Promotors die Sequenz der –35-Region von der Konsensussequenz TTGACA weiter entfernt.

Neben den erwähnten Untersuchungen zur Phänotypdiversität von Wildtypstämmen wurden einige Charakterzüge des *adrA*-Gens von *S. Typhimurium*, welches die Expression von Zellulose bei der Biofilmbildung steuert, aufgeklärt. AgfD induziert auf direktem oder indirektem Wege die Expression des *adrA*-Promotors, woraufhin dieses transkribiert und translatiert wird. AdrA tritt anschließend mit einem oder mehreren Produkten des *bcsABZC*-Operons in Wechselwirkung und bewirkt so die Bildung von Zellulose (RÖMLING ET AL., 2000; ZOGAY ET AL., 2001). Alternativ synthetisiert oder bindet AdrA c-di-GMP und aktiviert somit die Zelluloseproduktion (RÖMLING 2002).

β-Galaktosidaseaktivitätsmessungen mit Mutanten des *S. Typhimurium*-Stammes MAE 52 zeigten eindeutig, dass keine Abhängigkeit des *adrA* von den Produkten des *agfBAC*-Operons besteht. Darüber hinaus konnte mittels eines Expressionsvektors, in den das *adrA* hineinkloniert worden war, in einer *agfD*-Negativmutante des Stammes MAE 52 demonstriert werden, dass zwischen Transkription des *adrA* und Zelluloseexpression kein weiterer Schritt zwischengeschaltet ist, der von AgfD abhängig ist.

Die Unabhängigkeit der Zelluloseproduktion von OmpR oder  $\sigma^S$  nach erfolgter Transkription des *adrA* wurde durch entsprechende *ompR*- und *rpoS*-Phageninsertionsmutanten und besagtem Expressionsvektorkonstrukt nachgewiesen. Dass das *agfD* auch nach erfolgter Transkription unabhängig von OmpR ist, wurde mittels einer *agfD*- und *ompR*-Negativmutante und einem Expressionsvektor mit hineinkloniertem *agfD* demonstriert.

Anhand einer Mutante des Stammes MAE 52, die eine Gendeletion im Leserahmen des *adrA*-Gens aufwies, und eines Expressionsvektors mit intaktem *adrA* konnte gezeigt werden, dass das *adrA* nicht Bestandteil eines Operons ist. Die vermutliche funktionelle Domäne des *adrA*, welche das GGDEF-Motif enthält, reichte nicht zur Komplementation eines defekten *adrA* aus, wie Versuche mit einem High-Copy-Number-Expressionsvektor bewiesen. Eine Komplementation mit dem vollständigen *adrA* von *S. Typhimurium* in *E. coli* MC4100 und YMel sowie *P. putida* KT2440 verursachte in den entsprechenden Stämmen keine Zelluloseproduktion.

Auf dem Western Blot zeigte das mit His-tag markierte AdrA je nach Aufbereitungsmethode der Proben ein spezifisches Signal bei etwa 42 kDa oder bei 17 kDa. Anhand einer Zellfraktionierung und anschließender SDS-PAGE konnte auf dem entsprechenden Western Blot gezeigt werden, dass das AdrA tatsächlich ein Membranprotein ist.

Die Größe des primären *adrA*-Transkriptes wurde auf einem Northern Blot als etwa 1,4 kb bestimmt. Bei RNS-Präparationen von auf einer Agarplatte angezogenen Zellen erfolgte das Auftreten eines *adrA*-Signales erwartungsgemäß nur bei Stämmen, die über ein intaktes *agfD* und ein intaktes *adrA* verfügen. Bei RNS-Präparationen aus in Flüssigkultur angezogenen Zellen wurde das stärkste Signal in der logarithmischen Phase erzielt, während in der stationären Phase ein Abbau der spezifischen *agfD*- und *adrA*-RNS festzustellen war.

Mittels Primer Extension konnte der Transkriptionsstartpunkt des *adrA* bestimmt werden. Er liegt nur 14 Basen vom Startpunkt der Translation entfernt.

Der *adrA*-Promotor zeichnet sich durch eine der Konsensussequenz entsprechende und sehr dicht zum Transkriptionsstartpunkt gelegene vermutliche –10-Region sowie eine mit 20 Basen ungewöhnlich große Spacerregion zwischen vermutlicher –35- und vermutlicher –10-Region aus. Ein Vergleich des *adrA*-Promotors mit der Promotorregion des ebenfalls *agfD*-abhängigen *agfB* ließ wenig Gemeinsamkeiten erkennen.

Diese Ergebnisse sollen im Folgenden näher diskutiert werden.

## IV.1. Die Phänotypdiversität der einzelnen Stammgruppen:

### IV.1.1. Welche biologische Funktion hat eine hohe bzw. geringe Phänotypdiversität?

Die Expression von AgfA steht in Verdacht, unvorteilhaft für pathogene Stämme zu sein, die die gastrointestinale Barriere des Wirtes durchbrechen, da das AgfA möglicherweise ein gutes Ziel für die Immunantwort des Wirtes darstellt (SAKELLARIS ET AL., 2000; SUKUPOLVI ET AL., 1997A). Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass die untersuchten *Salmonella*-Stämme mit einer hohen Wirtsspezifität und einem invasiven Krankheitsverlauf zum Großteil weder dünne aggregative Fimbrien noch Zellulose exprimierten (BOKRANZ, diese Arbeit). Zumindest bei 37° C war dies auch bei der deutlichen Mehrheit der *Salmonella*-Stämme mit geringer Wirtsspezifität der Fall. Bei 28° C überwogen jedoch die Phänotypen, die sowohl dünne aggregative Fimbrien als auch Zellulose produzierten. Eine Temperatur von 37° C entspricht in etwa der Körpertemperatur der meisten Wirtstiere und fungiert für die Zelle möglicherweise als Signal für die Reduktion der AgfA-Expression. Eine niedrigere Temperatur zeigt der Bakterienzelle hingegen, dass sie sich in der Umwelt befindet und es hier mitunter vorteilhaft sein kann, sich mit Hilfe von dünnen aggregativen Fimbrien am Untergrund anzuheften, um eine ökologische Nische zu besetzen.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass RÖMLING ET AL., 2000 bei der hochregulierten Mutante des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028, welche bei 28° C und bei 37° C AgfA und Zellulose produziert, eine zehnfache Abnahme der Virulenz im Mausmodell gegenüber dem Wildtypstamm, der lediglich bei 28° C beide Komponenten der extrazellulären Matrix ausbildet, beobachten konnten. Wurde die Produktion von dünnen aggregativen Fimbrien und Zellulose in der hochregulierten Mutante MAE 52 durch Manipulation des *agfD*-Gens gänzlich unterbunden, so stieg deren Virulenz im Verhältnis zum Wildtyp, der den *rdar*-Morphotyp temperaturreguliert exprimiert, um das Dreifache.

Es gibt allerdings auch Beobachtungen, die dünnen aggregativen Fimbrien eine Rolle im Krankheitsverlauf zuschreiben. So konnte gezeigt werden, dass dünne aggregative Fimbrien zahlreiche Faktoren der wirtseigenen Blutgerinnungskaskade, z.B. Plasminogen sowie den entsprechenden gewebespezifischen Plasminogenaktivator t-PA, binden (BEN NASR ET AL., 1996; SJÖBRING ET AL., 1994). Der Aktivator spaltet ein kleines Peptid des Plasminogens ab,

wodurch das Plasminogen in seine aktive Form Plasmin überführt wird. Plasmin ist eine Protease, welche u. a. bei der Auflösung von Blutgerinnseln eine Rolle spielt (VOET & VOET 1994). Möglicherweise unterstützt Plasmin die Ausbreitung der Krankheitserreger, indem es die Auflösung von wirtseigenem Gewebe fördert und so das Eindringen der Bakterien in die Zellen ermöglicht (BEN NASR ET AL., 1996; LOTTENBERG ET AL., 1994; LÄHTEENMÄKI ET AL., 1995; PARKINEN ET AL., 1991). Somit scheint für die Anheftung an die Darmwand sowie den Beginn des Infektionszyklus die Produktion dünner aggregativer Fimbrien vorteilhaft für die Bakterienzelle zu sein.

Bei den *E. coli*-Stämmen gab es Unterschiede zwischen uropathogenen und kommensalen Stämmen bezüglich der Phänotypausprägung, wenngleich diese Unterschiede lediglich tendenzieller Art waren. Parallel zu den *Salmonella*-Stämmen waren auch bei diesen beiden Stammgruppen die Unterschiede bei einer Wachstumstemperatur von 37° C am offensichtlichsten. Waren bei den kommensalen Fäkalstämmen die Phänotypen rdar und rbdar bei dieser Temperatur noch häufig vertreten, so gab es bei den uropathogenen Stämmen lediglich einen einzigen Fall mit solch einem Phänotyp. Die Phänotypen bdar, bas bzw. saw(db) waren jedoch bei beiden Gruppen etwa gleich häufig vertreten. Dieser Sachverhalt spricht gegen die Theorie, dass AgfA ein gutes Ziel für die Immunantwort des Wirtes darstellt. Da dünne aggregative Fimbrien häufig bei Isolaten von Sepsispatienten vorkommen und dort die angeborene Immunität im Körper des Wirtes aktivieren, wurden diese als Virulenzfaktoren angesehen (BIAN ET AL., 2000 und 2001). Die Tatsache, dass der Phänotyp rdar (Produktion dünner aggregativer Fimbrien und Zellulose) in der aktuellen Untersuchung bei den uropathogenen Stämmen so gut wie überhaupt nicht auftrat, kann damit erklärt werden, dass bei Isolaten aus unterschiedlichen Krankheitsbildern – Sepsis (BIAN ET AL., 2000 und 2001) bzw. Harnwegsinfektionen (BOKRANZ, diese Arbeit) - dünne aggregative Fimbrien und Zellulose sowie gemeinsame bzw. einzelne Expression der Matrixkomponenten unterschiedliche Rollen in verschiedenen Infektionsverläufen spielen könnten.

Zellulose scheint für die Virulenz bzw. für die Immunantwort des Wirtes weniger von Bedeutung zu sein als AgfA. So war der Anteil an Stämmen, die lediglich Zellulose produzierten, bei den *Salmonella*-Stämmen mit hoher Wirtsspezifität neben den Phänotypen, die weder eine AgfA- noch Zelluloseexpression zeigten, ebenfalls mit starken Anteilen vertreten. Darüber hinaus waren bei den frischen *E. coli*-Isolaten die Phänotypen pdar, pas bzw. saw(p) bei den uropathogenen Stämmen häufiger vertreten als bei den Fäkalstämmen. RÖMLING ET AL., 2000 stellten bei einer Mutante des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1, die lediglich Zellulose und kein AgfA exprimieren konnte, keine Veränderung der Virulenz gegenüber der des Wildtypstammes im Mausmodell fest.

Generell gab es sowohl bei den frischen *E. coli*-Isolaten als auch bei den Vertretern der EcoR-Sammlung keine relevanten Unterschiede, was den Grad der AgfA- bzw. Zelluloseexpression anbelangte. Bei den uropathogenen *E. coli*-Stämmen schien insgesamt lediglich gegenüber den Fäkalstämmen eine leichte sukzessive Rückbildung der Fähigkeit, Biofilme auszubilden, vorzuliegen, was anhand des Phänotypvergleiches in Kapitel III.1.3.1.2. zu sehen ist. Möglicherweise lastet auf den überwiegend kommensalen *E. coli*-Stämmen ein geringerer Selektionsdruck als auf den überwiegend pathogenen *Salmonella*-Stämmen, was auch die generell höhere Phänotypdiversität bei *E. coli* gegenüber *Salmonella* erklären könnte. So könnte die Expression dünner aggregativer Fimbrien oder Zellulose durchaus nützlich für die Anheftung der Bakterien an Darmepithelzellen sein (SUKUPOLVI ET AL., 1997B) oder durch die Ausbildung von Zellklumpen die zwangsläufige Mitverdauung der Bakterienzellen im Darmlumen verzögern (ZOGAY ET AL., 2001). Uropathogene *E. coli*-Stämme sind möglicherweise nur fakultativ pathogen und müssen sich im Gegensatz zu den *Salmonella*-Serotypen mit hoher Wirtsspezifität somit die Fähigkeit erhalten, dünne aggregative Fimbrien und Zellulose für die Anheftung an die Zellen des Darmepithels produzieren zu können.

Eine andere plausible Erklärung für die vergleichsweise geringe Biofilmmatrixexpression der *Salmonella*-Stämme mit hoher Wirtsspezifität wie *S. Typhi* und *S. Typhimurium* var. Copenhagen gegenüber der uropathogenen *E. coli*-Stämme wäre, dass die entsprechenden *Salmonella*-Stämme möglicherweise lediglich auf Agarplatten keine Biofilmmatrix ausbilden, wohl aber in Abhängigkeit gewisser Umwelt-Signale. Für diese Annahme spricht, dass die getesteten *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme auf Eisenmangel mit Zelluloseproduktion reagierten. AUSMEES ET AL., 1999 konnten zeigen, dass der Kontakt zu den Spitzen von Wurzelhaarzellen höchstwahrscheinlich als Auslöser für die Zelluloseproduktion bei *Rhizobium leguminosorum* fungiert. Möglicherweise stellt der Kontakt zu Darmepithelzellen das Signal zur Produktion von Biofilmmatrix bei *Salmonella*-Serotypen mit hoher Wirtsspezifität dar.

In jedem Fall ist in Betracht zu ziehen, dass im Verlauf der Untersuchung die Induktion der Biofilmbildung in der Regel durch Herabsetzen der Salinität erfolgt ist. Ob Bakterien auch innerhalb eines Wirtsorganismus dünne aggregative Fimbrien oder auch Zellulose ausbilden, ist bislang noch nicht bekannt. Allerdings gibt es Indizien, die dafür sprechen. So stellten VAN DER VELDEN ET AL., 1998 bei einem *S. Typhimurium*-Stamm, der auf Grund eines ausgeschalteten *agfB*-Gens keine dünnen aggregativen Fimbrien mehr exprimieren konnte, eine dreifache Abnahme der Virulenz im Mausmodell gegenüber dem entsprechenden Wildtypstamm fest. RÖMLING ET AL., 2000 beobachteten bei der hochregulierten Mutante des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028 eine Abnahme der Virulenz im Mausmodell gegenüber dem Wildtypstamm mit temperaturabhängigem *agfD*-Promotor. Diese Beispiele zeigen, dass dünne aggregative Fimbrien offensichtlich zu einem gewissen Grad auch innerhalb eines Wirtsorganismus exprimiert werden. Andernfalls hätte eine Veränderung in der Ausprägung von dünnen aggregativen Fimbrien bzw. Zellulose keinen Einfluss auf die Virulenz der entsprechenden Stämme gehabt.

Bei ihren Versuchen mit *S. Enteritidis* in Hühnern kamen ALLEN-VERCOE ET AL., 1999 jedoch zu einem anderen Ergebnis. So zeigte eine Mutante, die zwar dünne aggregative Fimbrien aber keine Flagellen ausbilden konnte, eine reduzierte Virulenz gegenüber der des entsprechenden Wildtypstammes. Eine Mutante hingegen, die lediglich Flagellen und keine dünnen aggregativen Fimbrien mehr exprimieren konnte, erwies sich als ebenso virulent wie der Wildtypstamm. Dies deutet darauf hin, dass zumindest bei *S. Enteritidis* in diesem Modell dünne aggregative Fimbrien gegenüber Flagellen im Infektionszyklus anscheinend eine untergeordnete Rolle spielen (vgl. ALLEN-VERCOE & WOODWARD 1999B) und möglicherweise auch überhaupt nicht exprimiert werden. Offensichtlich ist die Expression von dünnen aggregativen Fimbrien innerhalb eines Wirtes folglich abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm sowie auch von der Art des Wirtsorganismus.

#### IV.1.2. Die Phänotypdiversität innerhalb einzelner Stämme bei EcoR- und LT-Sammlung:

Bei zahlreichen Stämmen der EcoR- und LT-Sammlung wurde festgestellt, dass mehrere verschiedene Phänotypen pro Stamm auftraten, obwohl davon auszugehen ist, dass ursprünglich bei der Isolierung pro Stamm jeweils ein einzelner Klon isoliert und als Glycerolstock eingefroren worden war. Diese Phänotypdiversität innerhalb einzelner Stämme könnte mit Mutationen induziert durch Veränderungen, die die Lagerungsbedingungen der Stämme betreffen, erklärt werden. Eine lückenlose Dokumentation über die Lagerungsbedingungen der Stammsammlungen vom Zeitpunkt der Stammsisolierung bis zum Zeitpunkt der Untersuchung lag jedoch nicht vor.

Um zu testen, welche Lagerungsbedingungen unter Umständen eine hohe Mutationsrate zur Folge haben, wurde mit dem *S. Typhimurium*-Stamm MAE 52 das folgende Experiment durchgeführt:

Der Stamm wurde zunächst vom Glycerolstock auf jeweils zwei LB-ohne-Salz- und CR-Agarplatten ausgestrichen und diese für 24 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Phänotyp der Einzelkolonien auf den CR-Platten kontrolliert. Die jeweils letzte der Einzelkolonien auf den LB-ohne-Salz-Platten wurde dann zum weiteren Ausstreichen auf jeweils zwei neue CR- und LB-ohne-Salz-Agarplatten verwendet. Folgende Zwischenlagerungsbedingungen wurden auf diese Weise auf ihre Mutationsinduktion hin untersucht:

a) Inkubation für 24 h bei 37° C:

Die jeweils letzte Kolonie der beiden LB-ohne-Salz-Platten wurde abgenommen und erneut zum Ausstreichen auf jeweils zwei CR- bzw. LB-ohne-Salz-Platten verwendet. Es folgte eine Inkubation bei 37° C für 24 h. Danach wurde wiederum die jeweils letzte Kolonie zum Ausstreichen auf neue CR- und LB-ohne-Salz-Agarplatten verwendet, welche wieder für 24 h bei 37° C inkubiert wurden, usw.

b) Inkubation für fünf Tage bei 37° C:

Die jeweils letzte Kolonie der beiden LB-ohne-Salz-Platten wurde abgenommen und erneut auf jeweils zwei CR- und LB-ohne-Salz-Platten ausgestrichen, welche anschließend für fünf Tage in einem feuchten Behältnis bei 37° C inkubiert wurden. Danach wurde wiederum die jeweils letzte der auf den LB-ohne-Salz-Platten befindliche Einzelkolonie zum weiteren Ausstreichen verwendet und die Prozedur wiederholt.

c) Inkubation für fünf Tage bei 4° C:

Verfahren wurde im Wesentlichen wie in Abschnitt a). Jedoch fand nach der Inkubation für 24 h bei 37° C eine Zwischenlagerung für fünf Tage bei 4° C statt, bevor erneut ausgestrichen wurde.

d) Inkubation für 15 Tage bei 4° C:

Es wurde wie in Abschnitt c) beschrieben vorgegangen. Allerdings wurde die Zwischenlagerung bei 4° C auf 15 Tage ausgedehnt.

e) Inkubation für 28 Tage bei 4° C:

Vorgegangen wurde wie in Abschnitt c), jedoch betrug der Zeitraum der Zwischenlagerung bei 4° C 28 Tage.

Das ganze Experiment hatte eine Laufzeit von drei Monaten. Interessanterweise konnte in keinem Fall eine Veränderung des Phänotyps festgestellt werden. Der Stamm MAE 52 erwies sich als extrem mutationsstabil, zumindest was Mutationen anbelangte, die sich auf den Phänotyp auswirkten. Somit konnte auch bei keiner der Lagerungsbedingungen eine mutationsfördernde Wirkung nachgewiesen werden.

Möglicherweise beruhte die Phänotypdiversität in einzelnen Stämmen der beiden Sammlungen auf Mutationen, welche durch häufigeres Antauen und wieder Einfrieren der Glycerolstocks induziert worden waren. Solche Bedingungen wurden mit dem Stamm MAE 52 nicht getestet.

### IV.1.3. Der Einfluss von Eisenmangel auf die Ausprägung von Biofilmen:

Es wurde festgestellt, dass Eisenmangel bedingt durch den Chelator 2,2-Dipyridyl eine serotypspezifische Antwort bei den einzelnen Stämmen hervorrief. So zeigten die *S. Enteritidis*-Stämme überwiegend keine Veränderung in der Produktion von AgfA bzw. Zellulose. Die *S. Typhimurium*-Stämme hingegen reagierten mit erhöhter AgfA-, die

*S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme mit erhöhter Zelluloseproduktion auf den Eisenmangel.

Die Eisenionenkonzentration der Umgebung dient den Bakterienzellen neben der Außentemperatur möglicherweise als Indikator für ihren Aufenthaltsort. Die Anheftung der Bakterienzellen an die Darmwand ist bei *Salmonella* in jedem Fall der erste Schritt eines jeden Infektionszyklus (HOUSE ET AL., 2001; MEYERHOLZ ET AL., 2002). Diese Anheftung wird durch die Expression dünner aggregativer Fimbrien bzw. Zellulose möglicherweise begünstigt. SUKUPOLVI ET AL., 1997A fanden heraus, dass *S. Typhimurium*-Stämme, die die Fähigkeit besaßen, bei 37° C dünne aggregative Fimbrien auszubilden, eine höhere primäre Infektionsrate gegenüber Stämmen aufwiesen, die bei 37° C keine dünnen aggregativen Fimbrien ausbildeten. Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass – zumindest bei *S. Typhimurium* - die Eisenionenkonzentration der Umgebung als Auslöser für die Ausbildung dünner aggregativer Fimbrien oder auch Zellulose dient.

Die Tatsache, dass die *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme nicht mit verstärkter AgfA-sondern lediglich mit einer leicht erhöhten Zelluloseproduktion auf den Eisenmangel reagierten, ist als Hinweis auf eine mögliche Wirtsadaption bei diesen Stämmen zu werten. Dass das Immunsystem gegen AgfA Produktion selektiert, wurde bereits angesprochen. Für Zellulose gilt dies höchstwahrscheinlich nicht (s. Kapitel IV.1.1.). Es sei jedoch noch einmal erwähnt, dass die *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme lediglich bei 28° C Eisenmangelbedingungen ausgesetzt wurden. Möglicherweise war also die Verbindung der niedrigen Temperatur mit dem Eisenmangel zusammen der Auslöser für die verstärkte Zelluloseexpression, welche in freier Umgebung eine Anheftung der Zellen am Untergrund bzw. die Ausbildung eines Biofilms bewirken würde.

Die *S. Enteritidis*-Stämme gehören wie die *S. Typhimurium*-Stämme der Pathogenitätsgruppe mit geringer Wirtsspezifität an und sind somit lediglich fakultativ pathogen. Allerdings scheinen Unterschiede im Bezug auf den Grad der Anpassung an ein Leben innerhalb eines Wirtsorganismus zwischen *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* zu bestehen. So zeigten die *S. Enteritidis*-Stämme im Gegensatz zu den *S. Typhimurium*-Stämmen keinerlei Reaktion auf den Eisenmangel. Dieser Sachverhalt könnte für eine stufenähnliche Entwicklung der Biofilmbildung innerhalb der verschiedenen *Salmonella*-Spezies sprechen.

#### IV.1.4. AgfA-Varianten mit abnormem Laufverhalten:

Das abnorme Laufverhalten zweier AgfA-Varianten, die bei zwei *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden konnten, war nicht durch eine Größenänderung der Proteine beruhend auf Insertionen, Deletionen oder durch ein vorzeitiges Stopp-Codon, welches auf Grund einer Verschiebungen des Leserasters entstanden war, zu erklären. Die meisten Punktmutationen gegenüber der entsprechenden *E. coli*-K-12-Sequenz waren stille Mutationen. Die Basenaustausche, die sich auf die Proteinsequenz auswirkten, lagen allesamt in weniger konservierten Bereichen des AgfA.

Da die Elektrophorese wie üblich unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, kann das veränderte Laufverhalten nicht auf eine Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins zurückzuführen sein. Möglicherweise sind posttranslationelle Veränderungen einiger der Aminosäuren, z.B. durch Hydroxylierung, Acetylierung, Methylierung, Carboxylierung, Glykosylierung, Nukleotidylierung, Phosphorylierung oder ADP-Ribosylierung (VOET & VOET 1994), die Ursache für das abnorme nicht der molekularen Masse des AgfA entsprechende Laufverhalten im SDS-Gel.

#### IV.1.5. Zusammenhänge zwischen Phänotyp, Serotyp, Prototrophie und Motilität:

Ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Serotyp konnte zumindest bei *E. coli* nicht nachgewiesen werden. Diese beiden Parameter scheinen gänzlich voneinander unabhängig zu sein. Ähnliches gilt offensichtlich bei *E. coli* und *Salmonella* für Phänotyp und Prototrophie und zumindest bei *Salmonella* auch für Phänotyp und Motilität.

Allerdings scheint bei *Salmonella* ein gewisser Zusammenhang zwischen Serotyp und Prototrophie bzw. Serotyp und Motilität zu bestehen. So waren mit einer Ausnahme alle *S. Typhi*-Stämme auxotroph. Darüber hinaus waren alle *S. Typhi*-Stämme sowie sieben von elf *S. Choleraesuis*-Stämmen möglicherweise auf Grund reduzierter Flagellenbildung weitgehend nicht motil. Sowohl *S. Typhi* als auch *S. Choleraesuis* gehören zu der Gruppe von *Salmonella*-Spezies mit hoher Wirtsspezifität. Auxotrophe Stämme können außerhalb eines Wirtsorganismus nicht überleben. Genauso sind Bakterienstämme, die unbeweglich sind, in der Umwelt gegenüber beweglichen Bakterienstämmen benachteiligt, da eine schnelle Ausbreitung für die Erschließung neuer Raum- und Nahrungsressourcen von Vorteil sind (RÖMLING & ROHDE 1999). Bewegliche Stämme können sich so besser gegen Nahrungskonkurrenten durchsetzen als unbewegliche Stämme. Somit sind der Verlust der Prototrophie bzw. der Motilität als Folgen einer Wirtsadaption anzusehen. Allerdings konnten ALLEN-VERCOE & WOODWARD 1999A bei *S. Enteritidis* in einem In-Vitro-Experiment, bei dem die Anheftung von nicht motilen Mutanten an den Epithelzellen eines Hühnerdarmes untersucht wurde, feststellen, dass die Anheftung der nicht motilen Stämme an die Darmwand gegenüber der von motilen Stämmen deutlich gestört war. Dies war sowohl bei Mutanten, welche keine Flagellen mehr ausbilden konnten als auch bei Mutanten, die zwar Flagellen ausbildeten, aber dennoch nicht motil waren, zu beobachten. Entsprechende In-Vivo-Versuche in Hühnern zeigten, dass nicht motile *S. Enteritidis*-Stämme deutlich kürzer im Darm persistierten als der jeweilige Wildtypstamm (ALLEN-VERCOE & WOODWARD 1999B).

Flagellen sind immunogene Komponenten, d.h. sie lösen im Wirtsorganismus eine Immunantwort aus (GEWIRTZ ET AL., 2001; LIAUDET ET AL., 2002). Da Flagellen zumindest bei *Salmonella* aber auch für die Virulenz gebraucht werden (PARKER & GUARD-PETTER 2001), ist ihnen eine duale Rolle zuzusprechen.

#### IV.1.6. RpoS als Sigmafaktor der stationären Phase:

Die  $\sigma^S$ -Untereinheit der RNS-Polymerase stellt einen Hauptregulator der allgemeinen physiologischen Zellantwort auf Stressbedingungen, wie bei zahlreichen Bakterienspezies dar (HENGGE-ARONIS 2002; WILSON ET AL., 2002). Darüber hinaus wird *rpoS* erst gegen Ende der logarithmischen und während der stationären Wachstumsphase transkribiert.  $\sigma^S$  ist somit ein Sigmafaktor der stationären Wachstumsphase (THOMSEN ET AL., 2002).

Biofilmbildung ist bei *Salmonella* und *E. coli* gleichermaßen eine Antwort auf Stressbedingungen wie Eisenmangel, niedrige Osmolarität oder niedrige Temperatur. Dieser Sachverhalt impliziert, dass die Transkription von *agfD* als Hauptregulatorgen der Biofilmbildung möglicherweise von  $\sigma^S$  abhängig ist. Dies scheint bei zahlreichen *S. Typhimurium*-Wildtypstämmen wie auch dem *S. Typhimurium*-Stamm ATCC14028-1s (UMR1) tatsächlich der Fall zu sein (s. Kapitel III.1.6.2.). Bei den untersuchten *S. Enteritidis*-Wildtypstämmen (s. Kapitel III.1.6.2.) sowie bei *S. Typhimurium* ATCC14028-4r (MAE52), der Morphotypvariante von *S. Typhimurium* ATCC14028, ist lediglich das *adrA* zu 50 – 100 % abhängig von  $\sigma^S$  (s. Kapitel III.2.2.5. und III.2.5.; vgl. RÖMLING ET AL., 1998B). Bei Mutanten dieser Stämme mit beeinträchtigter *rpoS*-Funktionalität ist also lediglich die Zelluloseexpression ausgeschaltet bzw. abgeschwächt.

Wildtypstämme von *E. coli* und *Salmonella*, bei denen mittels Katalasetest eine eingeschränkte Funktionalität des *rpoS*-Gens nachgewiesen werden konnte, zeigten zum überwiegenden Teil einen saw/saw-Gesamt-Phänotyp. In diesen Fällen könnte der Defekt, Biofilme auszubilden, auf einen Gendefekt im *rpoS*-Gen zurückzuführen sein, vorausgesetzt, dass - parallel zu den in Kapitel III.1.6.2. untersuchten *S. Typhimurium*-Wildtypstämmen - auch bei diesen Stämmen eine Abhängigkeit des *agfD* von  $\sigma^S$  besteht. Bei vielen anderen Wildtypstämmen mit eingeschränkter Katalaseaktivität war hingegen – parallel zu entsprechenden Mutanten des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028 – lediglich die Zelluloseproduktion reduziert. Darüber hinaus gab es Stämme, die trotz eingeschränkter Katalaseaktivität bei mindestens einer der beiden Inkubationstemperaturen den Phänotyp rdar, pdar oder pas und keine verminderte CF-Bindung zeigten. In diesen Fällen scheint somit das *adrA* bzw. die Zelluloseproduktion unabhängig von  $\sigma^S$  zu sein.

Es sei jedoch an dieser Stelle noch einmal angemerkt, dass es sich bei dem Katalasetest lediglich um einen indirekten Nachweis der *rpoS*-Funktionalität handelt. In Kapitel III.1.6.1. wurde dieser Sachverhalt bereits angesprochen.

#### IV.1.7. Ist die Regulationskaskade, die zur Ausbildung eines Biofilms führt, bei allen *Salmonella*-Spezies gleich?

Um dieser Frage nachzugehen, wurden bei vier *S. Enteritidis*- und sechs *S. Typhimurium*-Wildtypstämmen gezielt Schlüsselgene der Regulationskaskade mittels Phagentransduktion ausgeschaltet. Anschließend wurden die CR-Phänotypen der entsprechenden Mutanten untersucht und so Erkenntnisse bezüglich der Regulationskaskade gewonnen. Bezüglich der meisten involvierten Regulationsfaktoren gab es Übereinstimmung der jeweiligen Genabhängigkeiten zu denen der Regulationskaskade des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC14028. Analog zum *S. Typhimurium*-Stamm UMR 1 war das *agfD*-Gen der *S. Typhimurium*-Wildtypstämme anscheinend abhängig von  $\sigma^S$  (s. Kapitel IV.1.6.; vgl. RÖMLING ET AL., 1998A und 1998B).

Eine interessante Abweichung von der Regel zeigte einer der *S. Enteritidis*-Wildtypstämme. Zusätzlich zu einer gewissen Unabhängigkeit des *agfD* von  $\sigma^S$  schien hier das *adrA* unabhängig von *AgfD* zu sein.

Allen untersuchten *Salmonella*-Stämmen gemein ist jedoch die Abhängigkeit des *agfD* von OmpR. Das OmpR/EnvZ-Zwei-Komponenten-System steuert die Biofilmbildung über Wahrnehmung der Osmolarität (PRIGENT-COMBARET ET AL., 1999 und 2001), wobei OmpR an den *agfD*-Promotor bindet. Dieses System ist hochkonserviert und dieser Regulationsweg ist bei allen untersuchten *Salmonella*-Stämmen wie auch *E. coli* identisch.

#### IV.1.8. Der Einfluss von Punktmutationen im *agfD*-Promotor auf die Transkriptionsrate des *agfD*:

Bei zahlreichen *Salmonella*-Stämmen wurde die intergenische Region zwischen *agfDEFG*- und *agfBAC*-Operon sequenziert, um den Ursachen für Unterschiede in der Phänotypausprägung auf den Grund zu gehen. Es wurden verschiedene Punktmutationen gegenüber der Sequenz des *S. Typhimurium*-Stammes UMR 1 aufgedeckt, von denen allerdings nur zwei Auswirkungen auf die Transkription des *agfD* und somit auf die Art der Phänotypausprägung hatten. Der *S. Enteritidis*-Stamm 97-00728/26 wies eine Punktmutation an Position -44 bezüglich des Transkriptionsstartpunktes des *agfD* inmitten der OmpR-Bindungsstelle auf. Ein Guanin war hier gegen ein Thymin ausgetauscht. Dieselbe Punktmutation wurde bei der Mutante des *S. Typhimurium*-Stammes SR-11, SR-11b,



festgestellt (RÖMLING ET AL., 1998B). Der Gesamt-Phänotyp (28° C/37° C) war bei 97-00728/26 und SR-11b mit *rdar/rdar* identisch. Der *agfD*-Promotor beider Stämme war somit durch die Mutation temperaturunabhängig geworden. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt ist, dass ein bestimmter Inhibitor normalerweise die OmpR-Bindungsstelle bei 37° C blockiert. Durch die Punktmutation an Position –44 ist möglicherweise die Bindungsstelle so verändert, dass der Inhibitor nicht mehr bindet, wodurch OmpR auch bei 37° C den *agfD*-Promotor anschalten kann.

Eine andere Punktmutation, die möglicherweise Einfluss auf die Phänotypausprägung der entsprechenden Stämme hat, wurde bei fünf der zehn *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme aufgedeckt. Bei dieser Punktmutation handelt es sich um einen Basenaustausch von G nach T an Position –33 bezüglich des *agfD*-Transkriptionstartpunktes innerhalb der –35-Region des Promotors. Das Guanin an dritter Position der –35-Region ist hochkonserviert (HARLEY & REYNOLDS 1987; HAWLEY & MC CLURE 1983; WALKER ET AL., 1998). So ist durchaus denkbar, dass ein Basenaustausch von G nach T gravierende Änderungen bezüglich der Bindungsaffinität des entsprechenden Sigmafaktors zur DNS bewirkt. So stellten WALKER ET AL., 1998 bei Untersuchungen am *fis*-Promotor bei *E. coli* fest, dass, wenn das T an dritter Stelle der –35-Region durch ein G ersetzt wurde, dies in einem Vektorkonstrukt eine bis zu 18fache Transkriptionssteigerung hervorrief.

Allerdings steht der direkte Nachweis dafür, dass der vollständige Verlust, Biofilme auszubilden, bei den entsprechenden fünf *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämmen tatsächlich auf diese eine Punktmutation zurückzuführen ist, noch aus. Die übrigen fünf *S. Typhimurium* var. Copenhagen-Stämme, welche keine Mutation im *agfD*-Promotor aufwiesen, zeigten ebenfalls den Gesamt-Phänotyp (28° C/37° C) *saw/saw*. Folglich müssen hier noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

## IV.2. Das *adrA*-Gen von *S. Typhimurium*

### IV.2.1. Die Rolle des AdrA innerhalb der Biofilm-regulationskaskade:

Im Verlauf der Untersuchung wurden zahlreiche Zusammenhänge bezüglich der Regulationskaskade, welche der Biofilmbildung zugrunde liegt, aufgedeckt. So wird die Transkription des *agfD* im *S. Typhimurium*-Stamm ATCC14028-1s (UMR 1) durch OmpR und  $\sigma^S$  in der stationären Wachstumsphase bei niedriger Temperatur und herabgesetzter Osmolarität angeregt (PRIGENT-COMBARET ET AL., 2001; RÖMLING ET AL., 2000 und 1998B). Der Transkriptionsfaktor  $\sigma^S$  induziert zusätzlich zu 50 – 100 % das *adrA*. Das *agfBAC*-Operon, welches die Strukturgene enthält, die für die Bildung der dünnen aggregativen Fimbrien kodieren, und das *adrA*-Gen sind beide zu 100 % abhängig von AgfD. Nach Anschalten des *agfBAC*- bzw. *adrA*-Promotors durch AgfD werden dünne aggregative Fimbrien sowie das AdrA exprimiert, welches mit einem oder mehreren Produkten des *bcsABZC*-Operons interagiert und so die Bildung von Zellulose induziert. *BcsA* kodiert für eine Zellulosesynthase, die Funktion der anderen Gene ist bislang noch nicht geklärt (ZOGAY ET AL., 2003). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass das *bcsABZC*-Operon unabhängig von AgfD exprimiert wird (ZOGAY ET AL., 2001). Zur Bildung von Zellulose kommt es aber erst durch das Wechselspiel mit AdrA. Welcher Art dieses Wechselspiel ist, bedarf bislang noch der Klärung. Möglicherweise spielt c-di-GMP hier eine Rolle. Die C-terminale vermutlich zytosolische Domäne des AdrA enthält ein charakteristisches GGDEF-Motif, welches im Verdacht steht, entweder c-di-GMP zu binden oder zu produzieren. Die Synthese von Zellulose wird also möglicherweise durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen AdrA und einem bzw. mehreren Produkten des *bcsABZC*-Operons oder aber indirekt durch die

Produktion bzw. Bindung von c-di-GMP gesteuert (RÖMLING ET AL., 2002). So ist z.B. denkbar, dass entweder der Spiegel an c-di-GMP innerhalb der Zelle den Grad an Zelluloseproduktion bestimmt.

## IV.2.2. Gibt es ergänzende Regulationsfaktoren in der Kaskade?

Es gibt einige Indizien, die dafür sprechen. In Abb. 31 sind Bindungsstellen diverser Faktoren, die anhand von Computervorhersagen in der intergenischen Region zwischen *agfDEFG*- und *agfBAC*-Operon ermittelt worden waren (RÖMLING ET AL., 2003), eingezeichnet. Es wurden neben den beiden OmpR-Bindungsstellen eine CpxR- sowie eine IHF-Bindungsstelle im *agfD*-Promotorbereich und eine CpxR2-Bindungsstelle im *agfB*-Promotor aufgedeckt (GERSTEL ET AL., unveröffentlicht; PRIGENT-COMBARET ET AL., 2001).

CpxR ist wie OmpR Bestandteil eines Zwei-Komponenten-Systems und wird wie RpoS unter physiologischen Stressbedingungen höchstwahrscheinlich hervorgerufen durch Kontakt mit anderen Zelloberflächen aktiviert (OTTO & SILHAVY 2002). CpxA ist eine in der inneren Zellmembran lokalisierte Histidinkinase, die den Regulator CpxR phosphoryliert (OTTO & SILHAVY 2002). Dieser fungiert dann als Repressor, indem er an die entsprechende Bindungsstelle der DNS im Promotorbereich des entsprechenden Gens bindet (DOREL ET AL., 1999). Die gefundene CpxR-Bindungsstelle im Promotorbereich des *agfD* liegt genau innerhalb der Bindungsstelle für OmpR. Möglicherweise konkurriert der Repressor CpxR mit dem Aktivator OmpR um die DNS-Bindungsstelle (DOREL ET AL., 1999; PRIGENT-COMBARET ET AL., 2001). Der *S. Typhimurium*-Stamm MAE 52 sowie der *S. Enteritidis*-Stamm 97-00728/26 zeichnen sich durch eine Punktmutation innerhalb der einen OmpR-Bindungsstelle aus, welche den *agfD*-Promotor temperaturunabhängig macht. Da diese Punktmutation sich in unmittelbarer Nähe zur CpxR-Bindungsstelle befindet (s. Abb. 31), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei CpxR um den in Kapitel IV.1.8. angesprochenen Inhibitor handelt.

Das System funktioniert möglicherweise folgendermaßen (DOREL ET AL., 1999): Während der logarithmischen Wachstumsphase fungiert CpxA als Kinase und phosphoryliert CpxR. Dieser phosphorylierte Faktor CpxR blockiert die OmpR-Bindungsstelle im *agfD*-Promotor, wodurch OmpR nicht an die DNS binden und den *agfD*-Promotor anschalten kann. Bei beginnender stationärer Wachstumsphase steigt die Zahl der miteinander in Verbindung tretenden Zellen. Dies induziert die Phosphataseaktivität der membranständigen Histidinkinase CpxA, welche in zunehmendem Maße CpxR dephosphoryliert. Dies legt die OmpR-Bindungsstelle des *agfD*-Promotors frei, OmpR bindet und die Regulationskaskade, die zur Biofilmbildung führt, wird in Gang gesetzt.

DOREL ET AL., 1999 untersuchten eine Mutante des *E. coli*-Stammes K-12, welche eine Mutation im *cpxA*-Gen aufwies, die eine stark verminderte Phosphataseaktivität der Kinase CpxA bewirkte. Der entsprechende Stamm war in seiner AgfA-Expression deutlich eingeschränkt. Die Autoren vermuteten, dass die reduzierte Phosphataseaktivität eine Akkumulation von phosphoryliertem CpxR zur Folge hatte, welche die Biofilmbildung weitgehend unterband. Dieser Sachverhalt spricht für die oben aufgestellte mögliche Funktionsweise des CpxA/CpxR-Systems innerhalb der Biofilmregulationskaskade. Der Nachweis hierfür steht jedoch noch aus.

Über die Funktion von IHF (Integration host factor) und CpxR2 innerhalb der Biofilmregulationskaskade finden sich in der Literatur bislang keine Hinweise. Die Funktion von IHF wird zur Zeit von Herrn U. Gerstel im Labor von Frau Dr. U. Römling, Karolinska Institut, Stockholm, untersucht.

### IV.2.3. Die Stabilität des primären *adrA*-Transkriptes:

Die Leader-Sequenz zwischen Transkriptions- und Translationsstartpunkt der mRNA des *adrA* ist mit 14 –16 Basen als sehr kurz anzusehen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Halbwertszeit der *adrA*-mRNA offensichtlich gering ist, da innerhalb einer so kurzen Leader-Sequenz kaum Sekundärstrukturen ausgebildet werden können. Sekundärstrukturen wie Stem-Loops können den Abbau von mRNA verzögern (EMORY ET AL., 1992; HAMBRAEUS ET AL., 2000).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die mRNA des *adrA* sehr kurzlebig ist, ist das *adrA*-Signal auf dem Northern-Blot selber, welches keine konkrete Bande darstellt. Es beginnt zwar an einer bestimmten Höhe auf dem Blot, zeigt aber von seinem Beginn an über eine weite Strecke einen deutlichen Schmier, während die anderen RNS-Signale stabil sind.

Da die Produktion von Zellulose einen enormen Energieaufwand für die Zelle bedeutet, muss gewährleistet sein, dass Zellulose nur dann exprimiert wird, wenn dies der Zelle nützt. Somit bedarf die Zellulosesynthese einer genauen Kontrolle. Zur Kontrollierbarkeit dieses Systems trägt eine kurzlebige mRNA besser bei als eine langlebige, zumal von einer langlebigen mRNA noch lange über den Zeitpunkt der Transkription hinaus nachwirkende Effekte zu erwarten sind. Dies wäre kontraproduktiv, da die Zelle mitunter auf schnell wechselnde Umweltbedingungen reagieren muss. Somit erscheint es durchaus sinnvoll, dass die mRNA eines Regulatorgens eine geringe Halbwertszeit besitzt. Die postulierte geringe Halbwertszeit könnte mit einem mRNA-Stabilitätsversuch (EMORY & BELASCO 1990; EMORY ET AL., 1992) nachgewiesen werden.

## IV.3. Ausblick:

Es konnte gezeigt werden, dass AdrA ein Membranprotein ist. Eine Zuordnung zur inneren oder äußeren Membran mittels Zellfraktionierung war jedoch nicht möglich, da das Protein anscheinend so schwer zu solubilisieren war, dass das entsprechende Signal zu großen Teilen immer in der äußeren Membranfraktion auftrat. Dies stand in Widerspruch zu Computerprogrammvorhersagen, nach denen das AdrA ein Protein der inneren Membran ist. Darüber hinaus fehlte ein zuverlässiger Marker für die innere Membran, so dass keine verbindliche Aussage über die Qualität der jeweiligen Auftrennung getroffen werden konnte. Der Versuch, nähere Erkenntnisse bezüglich der genauen Position des AdrA in der Zelle via Immunogoldmarkierung und EM-Studien zu erhalten, war ebenfalls erfolglos. Möglicherweise ist AdrA in so geringen Mengen in der Zellmembran vorhanden, dass zwischen AdrA-Signal und Hintergrundrauschen nicht zu unterscheiden war. Die genaue Lokalisation des AdrA in der Zelle konnte also im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden und stellt weiterhin eine Herausforderung für künftige Untersuchungen dar.

Der Transkriptionsstartpunkt und somit auch die Promotorregion des *adrA*-Gens konnten aufgedeckt werden. Innerhalb des Promotors traten Elemente auf, die höchstwahrscheinlich die –10- und –35-Region des Promotors darstellen. Aus Zeitgründen konnte dies jedoch nicht mehr überprüft werden. Eine Überprüfung könnte durch Experimente erfolgen, bei denen die Promotoraktivität durch transkriptionelle Fusionen ermittelt wird. Mit Gelretardationsexperimenten, bei denen der Promotorbereich mit Proteinextrakten inkubiert und anschließend auf einem Gel aufgetrennt wird, ließe sich zeigen, ob AgfD direkt an die DNS des *adrA*- bzw. des *agfB*-Promotors bindet oder nicht. Durch Deletieren entsprechender Regionen beider Promotoren könnte die genaue Lage der AgfD-Bindungsstelle auf der Promotor-DNS ermittelt werden.

Das *adrA*-Gen von *S. Typhimurium* spielt eine Schlüsselrolle bei der Steuerung der Zelluloseexpression. Die Gewährleistung, dass nur dann Zellulose produziert wird, wenn dies für die Zelle von Nutzen ist, ist energetisch betrachtet ein großer Vorteil für die Bakterienzelle. Für eine sehr kontrollierte Regulation der Zelluloseexpression spricht unter anderem, dass das

*adrA*-Transkript relativ kurzlebig ist, was entsprechende mRNS-Signale auf Northern Blots zeigten. Was nach erfolgter Translation des *adrA*-Transkriptes letztendlich die Zelluloseproduktion bewirkt, ist nach wie vor ungeklärt. Vermutlich verläuft die Regulation über das Binden bzw. die Produktion von c-di-GMP durch AdrA.

Offensichtlich ist Zelluloseproduktion in kommensaler Gemeinschaft sinnvoller als bei pathogenen Stämmen. Innerhalb pathogener Stämme ließ sich eine weitere Unterscheidung treffen. So zeigten wirtsadaptierte *Salmonella*-Serotypen im Gegensatz zu Serotypen mit breiter Wirtsspezifität eine starke Einschränkung in ihrer Fähigkeit, Biofilme auszubilden.

Welche konkrete Rolle dünne aggregative Fimbrien und Zellulose bei Infektionswegen von pathogenen Bakterienstämmen spielen, bleibt nach wie vor ungeklärt. Fest steht lediglich, dass Unterschiede in ihrer Expression je nach Infektionsweg bestehen. Künftige Untersuchungen sollten sich somit der Frage annehmen, welche Funktion diesen Organellen im Infektionsverlauf bei *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* zukommt und welche Parameter innerhalb eines Wirtes die Expression dünner aggregativer Fimbrien unterstützen bzw. unterbinden.

## V. Zusammenfassung:

Bakterielle Biofilme sind sowohl im medizinischen Bereich als auch bei Verarbeitung, Aufbereitung und Lagerung von Lebensmitteln und Trinkwasser problematisch, weil sie in der Regel nach erfolgter Manifestation weder mit Antibiotika noch mit Detergenzien erfolgreich bekämpft werden können. Bei einzelnen Laborstämmen von *Escherichia coli* und *Salmonella* Typhimurium konnten in der Vergangenheit Curli bzw. dünne aggregative Fimbrien und Zellulose als Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix des Biofilms identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit diese beiden Biofilmkomponenten in repräsentativen Populationen von kommensalen und extraintestinalen *Escherichia coli*-Stämmen sowie bei *Salmonella enterica*-Serotypen vorkommen. Uropathogene sowie kommensale *Escherichia coli*-Stämme exprimierten sowohl Zellulose als auch Curli. Während Zelluloseproduktion bei 37° C bei uropathogenen Stämmen häufiger auftrat als bei den kommensalen Stämmen, war die Häufigkeit der Expression von Curli bei beiden Stammgruppen etwa gleich. Jedoch war die Phänotypdiversität der Fäkalstämmen deutlich höher als die der uropathogenen Stämme. *Salmonella enterica*-Serotypen mit hoher Wirtsspezifität wie *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen und *Salmonella* Gallinarum-Pullorum produzierten so gut wie keine Biofilmmatrix, während Serotypen mit geringer Wirtsspezifität wie *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis temperaturreguliert Biofilmmatrix ausbildeten. Isolate von *Escherichia coli*- und *Salmonella* Typhimurium-Stammsammlungen zeigten wider Erwarten eine hohe Phänotypdiversität, eine Tatsache, die auf inadäquate Lagerungsbedingungen bzw. Prozessierung dieser Stämme hindeutete.

Eisenmangel rief bei *Salmonella* Typhimurium eine erhöhte Produktion dünner aggregativer Fimbrien bei *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen erhöhte Zelluloseproduktion hervor. *Salmonella*-Serotypen mit hoher Wirtsspezifität zeigten eine deutlich reduzierte Motilität sowie eingeschränkte Prototrophie, was als Anpassung an ein Leben innerhalb eines Wirtes zu werten war.

Die Regulationskaskade, welche zur Ausbildung eines Biofilms bei *Salmonella* Typhimurium ATCC14028-1s notwendig ist, beginnt mit der Aktivierung des *agfD*-Promotors durch phosphoryliertes OmpR, wodurch eine  $\sigma^S$ -abhängige Transkription erfolgt. AgfD induziert die Bildung dünner aggregativer Fimbrien sowie die Transkription des *adrA*-Gens, welches anschließend die Produktion von Zellulose aktiviert. Eine identische Regulationskaskade fand sich in den untersuchten *Salmonella* Typhimurium-Wildtypstämmen, während in *Salmonella* Enteritidis-Stämmen die AgfD-Expression teilweise unabhängig von *rpoS* war. Ein Stamm zeigte eine Entkopplung der Zelluloseproduktion von *agfD* und *adrA*.

Sequenzanalyse der intergenischen Region zwischen *agfDEFG*- und *agfBAC*-Operon deckte bei ausgewählten *Salmonella*-Stämmen mit differentieller Biofilmbildung Punktmutationen gegenüber der Sequenz von *Salmonella* Typhimurium ATCC14028-1s auf. Wahrscheinlich beeinflussen jedoch nur Mutationen an Position -44 und -33 bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt des *agfD*-Gens die Biofilmbildung.

AdrA aktiviert die Zellulosebiosynthese. Durch Zellfraktionierung konnte nachgewiesen werden, dass das AdrA ein Membranprotein ist. Das primäre Transkript von *adrA* hat eine Größe von maximal 1,4 kb, somit ist *adrA* nicht Bestandteil eines Operons. Der Transkriptionsstartpunkt liegt nur 14 Basen vom Startpunkt der Translation entfernt. In der Regulationskaskade zur Zelluloseproduktion wird nach der Transkription des *agfD* kein OmpR und nach der Transkription des *adrA* kein RpoS zur Zelluloseproduktion mehr benötigt.



## VI. Literatur:

- ALLEN-VERCOE, E. & WOODWARD, M. J. (1999A): The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* to chick gut explant. *J. Med. Microbiol.* **48**: 771 – 780
- ALLEN-VERCOE, E. & WOODWARD, M. J. (1999B): Colonisation of the chicken caecum by afimbriate and aflagellate derivatives of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Vet. Microbiol.* **69**: 265 - 275
- ALLEN-VERCOE, E., SAYERS, A. R. & WOODWARD, M. J. (1999): Virulence of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. *Epidemiol. Infect.* **122**: 395 – 402
- ALPHEY, L. (1998): DNA-Sequenzierung; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin
- ANDREOLI-PINTO, T. J. & GRAZIANO, K. U. (1999): Important aspects of the colonization of central venous catheter. *Boll. Chim. Farm.* **138**: 19 - 23
- ARNQUIST, A., OLSEN, A. & NORMARK, S. (1994):  $\sigma^S$ -dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter can be achieved *in vivo* by  $\sigma^{70}$  in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **13**: 1021 - 1032
- ATLUNG, T., NIELSEN, H. V. & HANSEN, F. G. (2002): Characterisation of the allelic variation in the *rpoS* gene in thirteen K12 and six other non-pathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 873 – 881
- AUSMEES, N., JONSSON, H., HÖGLUND, S., LJUNGGREN, H. & LINDBERG, M. (1999): Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* **145**: 1253 - 1262
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., ET AL. (1994): Current Protocols in Molecular Biology; New York: John Wiley & Sons
- BALABAN, N., GOV, Y., BITLER, A. & BOELAERT, J. R. (2003): Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney Int.* **63**: 340 - 345
- BANG, I. S., KIM, B. H., FOSTER, J. W. & PARK, Y. K. (2000): OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* **182**: 2245 – 2252
- BATCHELOR, S. E., COOPER, M., CHHABRA, S. R., GLOVER, L. A., STEWART, G. S., WILLIAMS, P. & PROSSER, J. I. (1997): Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2281 - 2286

- BATCHELOR, E. & GOULIAN, M. (2003): Robustness and the cycle of phosphorylation and dephosphorylation in a two-component regulatory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 691 - 696
- BECK, B. J. & DOWNS, D. M. (1999): A periplasmic location is essential for the role of the ApbE lipoprotein in thiamine synthesis in *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* **181**: 7285 – 7290
- BEN NASR, A., OLSEN, A., SJÖBRING, U., MÜLLER-ESTERL, W. & BJÖRCK, L. (1996): Assembly of human contact phase proteins and release of bradikinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**: 927 - 935
- BIAN, Z., BRAUNER, A., LI, Y. & NORMARK, S. (2000): Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* **181**: 602 - 612
- BIAN, Z., YAN, Z.-Q., HANSSON, G. K., THOREN, P. & NORMARK, S. (2001): Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J. Infect. Dis.* **183**: 612 - 619
- BLOBEL, H. & SCHLIEßER, T. (1981): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren; Band III; Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart: 344 - 452
- BLUM, V., ANDRISKE, M., KREUZBERG, K., PAASSEN, U., SCHREIBMAN, M. P. & VOESTE, D. (1998): Novel laboratory approaches to multi-purpose aquatic bioregenerative closed-loop food production systems. *Acta Astronaut.* **42**: 25 - 35
- BOYD, E. F., WANG, F. S., WHITTAM, T. S. & SELANDER, R. K. (1996): Molecular genetic relationships of the *Salmonellae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 804 - 808
- BRAUN, J. E. & NEUSSER, H. J. (2002): Threshold photoionization in time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **21**: 16 – 36
- BRAUNER, A., BOEUFGRAS, J.-M., JACOBSON, S. H., KAIJSER, B., KÄLLENIUS, G., SVENSON, S. B. & WRETLIND, B. (1987): The use of biochemical markers, serotype and fimbriation in the detection of *Escherichia coli* clones. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2825 - 2834
- BULLAS, L. R. & RYU, J.-I. (1983): *Salmonella* Typhimurium LT 2 strains which are r<sup>-</sup> m<sup>+</sup> for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. *J. Bacteriol.* **156**: 471 – 474
- CHAPLIN, M. F. & KENNEDY, J. F. (1986): Carbohydrate analysis: A practical approach; IRL Press Oxford
- CHAPLIN, M. F. (1982): A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **32**: 336 - 341



- CHAPMAN, M. R., ROBINSON, L. S., PINKNER, J. S., ROTH, R., HEUSER, J., HAMMAR, M., NORMARK, S. & HULTGREN, S. J. (2002): Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**: 851 - 855
- CHEN, C.-Y., BUCHMEIER, N. A., LIBBY, S., FANG, F. C., KRAUSE, M. & GUINEY, D. G. (1995): Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella dublin* plasmid virulence genes. *J. Bacteriol.* **177**: 5303 – 5309
- CHRISTENSEN, G. D., SIMPSON, W. A. & BEACHLEY, E. H. (1985): Adhesion of bacteria to animal tissues; Complex mechanisms. Aus: SAVAGE D. C. & FLETCHER M.: Bacterial Adhesion - Mechanisms and physiological significance; Plenum-Press New York & London: 279 - 305
- COLEMAN, F. T., MUESCHENBORN, S., MELULENI, G., RAY, C., CAREY, V. J., VARGAS, S. O., CANNON, C. L., AUSUBEL, F. M. & PIER, G. B. (2003): Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1949 - 1955
- COLLINSON, S. K., CLOUTHIER, S. C., DORAN, J. L., BANSER, P. A. & KAY, W. W. (1996): *Salmonella* Enteritidis *agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.* **178**: 662 – 667
- COLLINSON, S. K., DOIG, P. C., DORAN, J. L., CLOUTHIER, S., TRUST, T. J. & KAY, W. W. (1993): Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. *J. Bacteriol.* **175**: 12 - 18
- COLLINSON, S. K., PARKER, J. M. R., HODGES, R. S. & KAY, W. W. (1999): Structural Predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae. *Journal of Molecular Biology* **290**: 741 – 756
- COSTERTON, J. W. (1995): Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* **15**: 137 – 140
- COSTERTON, J. W., CHENG, K. J., GEESEY, G. G., LADD, T. I., NICKEL, J. C., DASGUPTA, M. & MARRIE, T. J. (1987): Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 435 - 464
- DAVIES, D. G., PARSEK, M. R., PEARSON, J. P., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W. & GREENBERG E. P. (1998): The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295 - 298
- DE KIEVIT, T. R., GILLIS, R., MARX, S., BROWN, C. & IGLEWSKI, B. H. (2001): Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ. Microbiol.* **67**: 1865 - 1873
- DOREL, C., VIDAL, O., PRIGENT-COMBARET, C., VALLET, I. & LEJEUNE, P. (1999): Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 169 – 175
- EBERL, L. (1999): N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 493 - 506

- ELVERS, K. T., LEEMING, K. & LAPPIN-SCOTT, H. M. (2002): Binary and mixed population biofilms: Time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 331 - 338
- EMORY, S. & BELASCO, J. G. (1990): The *ompA* 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth rate regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J. Bacteriol.* **172**: 4472 - 4481
- EMORY, S. A., BOUVET, P. & BELASCO, J. G. (1992): A 5'-terminal stem loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes & Development* **6**: 135 - 148
- EVALDSON, G., HEIMDAHL, A., KAGER, L. & NORD, C. E. (1982): The normal human anaerobic microflora. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **35**: 9 - 15
- FANG, F. C., LIBBY, S. J., BUCHMEIER, N. A., LOEWEN, P. C., SWITALA, J., HARWOOD, J. & GUINEY, D. G. (1992): The alternative  $\sigma$  factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11978 - 11982
- FARMER III, J. J. & KELLY, M. T. (1991): *Enterobacteriaceae*. Aus: BALOWS, A., HAUSLER JR., W. J., HERRMANN, K. L., ISENBERG, H. D. & SHADOMY, H. J.: Manual of Clinical Microbiology; V. Edition; American Society for Microbiology Press Washington, D.C.: 360 - 383
- FINLAY, B. B. & SIEBERS, A. (1995): Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens. Aus: ROTH, J. A., BOLIN, C. A., BROGDEN, K. A., MINION, F. C., WANNEMUEHLER, M. J. ET AL.: Virulence mechanisms of bacterial pathogens; II. Edition; American Society for Microbiology Press Washington, D.C.: 33 - 45
- FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H., SMYTH, E., KENNEDY, C. A. & O'GARA, J. P. (2002): Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* **52**: 212 - 218
- FRANCIS JR., T. R. & BECKER, R. R. (1984): Specific indication of hemoproteins gels using a double-staining process. *Analytical Biochemistry* **136**: 509 - 514
- GERSTEL, U. & RÖMLING, U. (2001): Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella Typhimurium*. *Environmental Microbiology* **3**: 638 - 648
- GEWIRTZ, A. T., NAVAS, T. A., LYONS, S., GODOWSKI, P. J. & MADARA, J. L. (2001): Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* **167**: 1882 - 1885
- GILBERT, P., ALLISON, D. G. & MC BAIN, A. J. (2002A): Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.* **92**: 98 - 110
- GILBERT, P., MAIRA-LITRAN, T., MC BAIN, A. J., RICKARD, A. H. & WHYTE, F. W. (2002B): The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv. Microb. Physiol.* **46**: 202 - 256

- GUGNANI, H. C. (1999): Some emerging food and water borne pathogens. *J. Commun. Dis.* **31**: 65 – 72
- GUZMAN, L.-M., BELIN, D., CARSON, M. J. & BECKWITH, J. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the Arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121 – 4130
- HAMBRAEUS, G., PERSSON, M. & RUTBERG, B. (2000): The *aprE* leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 3051 – 3059
- HAMILTON, C. M., ALDEA, M., WASHBURN, B. K., BABITZKE, P. & KUSHNER, S. R. (1989): New Method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 4617 – 4622
- HAMMAR, M., ARNQVIST, A., BIAN, Z., OLSEN, A. & NORMARK, S. (1995): Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **18**: 661 - 670
- HARLEY, C. B. & REYNOLDS, R. P. (1987): Analysis of *E. coli* promotor sequences. *Nucleic Acid Research* **15**: 2343 – 2361
- HASSAN, J., FEIGHERY, C., BRESNIHAN, B., KEOGAN, M., FITZGERALD, M. X. & WHELAN, A. (1994): Serum IgA and IgG subclasses during treatment for acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis: analysis of patients colonised with mucoid or non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunol. Invest.* **23**: 1 - 13
- HASSETT, D. J., ELKINS, J. G., MA, J. F. & MC DERMOTT, T. R. (1999): *Pseudomonas aeruginosa* biofilm sensitivity to biocides: use of hydrogen peroxide as model antimicrobial agent for examining resistance mechanisms. *Methods Enzymol.* **310**: 599 - 608
- HAWLEY, D. K. & MC CLURE, W. R. (1983): Compilation and analysis of *Escherichia coli* promotor DNA sequences. *Nucleic Acid Research* **11**: 2236 – 2255
- HECHT, G. B. & NEWTON, A. (1995): Identification of a novel response regulator required for swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **177**: 6223 - 6229
- HENGGE-ARONIS, R. (2002): Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 373 – 395
- HODGES, N. A. & GORDON, C. A. (1991): Protection of *Pseudomonas aeruginosa* against ciprofloxacin and beta-lactams by homologous alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 2450 - 3002
- HOUSE, D., BISHOP, A., PARRY, C., DOUGAN, G. & WAIN, J. (2001): Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**: 573 – 578

- HULTGREN, S. J., HAL JONES, C. & NORMARK, S. (1996): Bacterial adhesions and their assembly in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Aus: NEIDHARDT, F. C. (ed.): *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium - Cellular and Molecular Biology; Volume 2; American Society for Microbiology Press Washington, D. C.: 2730 - 2756
- HUNNICUTT, D. W. & MC BRIDE, M. J. (2000): Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding-motility genes *gldB* and *gldC*. *J. Bacteriol.* **182**: 911 – 918
- JAIN, S., FRANKLIN, M. J., ERTESVAG, H., VALLA, S. & OHMAN, D. E. (2003): The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **47**: 1123 - 1133
- JAMES, G. A., KORBER, D. R., CALDWELL, D. E. & COSTERTON, J. W. (1995): Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp.. *J. Bacteriol.* **177**: 907 - 915
- JOHNSON, J. R., STELL, A. L., SCHEUTZ, F., O'BRYAN, T. T., RUSSO, T. A., CARLINO, U. B., FASCHING, C., KAVLE, J., VAN DIJK, L. & GAASTRA, W. (2000): Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay. *Infect. Immun.* **68**: 1587 - 1599
- JONES M. A., WIGLEY P., PAGE K. L., HULME S. D. & BARROW P. A. (2001): *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infect. Immun.* **69**: 5471- 5476
- KÄRST, U. (1985): Identifizierung unbekannter Proteine des lithoautotrophen Stoffwechsels von *Alcaligenes eutrophus*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Georg-August-Universität Göttingen
- KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERT, J. & ZINKERNAGEL, R. M. (1998): Medizinische Mikrobiologie; Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York
- KINGSLEY, R. A., VAN AMSTERDAM, K., KRAMER, N. & BAUMLER, A. J. (2000): The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect. Immun.* **68**: 2720 - 2727
- KNIPPERS, R., PHILLIPSEN, P., SCHÄFER, K. P. & FANNING, E. (1990): Molekulare Genetik; 5. Auflage; Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York
- KRESSE, A. U., DINESH, S. D., LARBIG, K. & RÖMLING, U. (2003): Impact of large chromosomal inversions on the adaption and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol. Microbiol.* **47**: 145 - 158
- LÄHTEENMÄKI, K., VIRKOLA, R., POUTTU, R., KUUSELA, P., KUKKONEN, M. & KORHONEN, T. K. (1995): Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* **63**: 3659 - 3664

- LE MAGREX-DEBAR E., LEMOINE J., GELLE M. P., JACQUELIN L. F., CHOISY C. (2000): Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging: *Int. J. Food Microbiol.* **55**: 239 - 243
- LEWIN, B. (1998): Molekularbiologie der Gene; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin
- LIAUDET, L., MURTHY, K. G. K., MABLEY, J. G., PACHER, P., SORIANO, F. G., SALZMAN, A. L. & SZABO, C. (2002): Comparison of inflammation, organ damage and oxidant stress induced by *Salmonella enterica* serovar Muenchen flagellin and serovar *enteritidis* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **70**: 192 – 198
- LILLEENGEN, K. (1948): Typing *Salmonella* Typhimurium by means of bacteriophage. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **77**: 1 - 149
- LOFERER, H., HAMMAR, M. & NORMARK, S. (1997): Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol. Microbiol.* **26**: 11 - 23
- LOTTENBERG, R., MINNING-WENZ, D. & BOYLE, M. D. P. (1994): Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol.* **2**: 20 - 24
- LUPPENS, S. B., REIJ, M. W., VAN DER HEIJDEN, R. W., ROMBOUTS, F. M. & ABEE, T. (2002): Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4194 - 4200
- LYTE, M., FREESTONE, P. P., NEAL, C. P., OLSON, B. A., HAIGH, R. D., BAYSTON, R. & WILLIAMS, P. H. (2003): Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet.* **361**: 130 - 135
- MAIRA-LITRAN, T., ALLISON, D. G. & GILBERT, P. (2000): An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 789 - 795
- MALOY, S. R., STEWART, V. J. & TAYLOR, R. K. (1996): Genetic analysis of pathogenic bacteria. Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press
- MATTATALL, N. R. & SANDERSON, K. E. (1996): *Salmonella* Typhimurium LT 2 possesses three distinct 23 S rRNA intervening sequences. *J. Bacteriol.* **178**: 2272 – 2278
- MATTHYSSE, A. G. (1983): Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.* **154**: 906 - 915
- MC CANN, M. P., KIDWELL, J. P. & MATIN, A. (1991): The putative  $\sigma$  factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4188 - 4194

- MEYERHOLZ, D. K., STABEL, T. J., ACKERMANN, M. R., CARLSON, S. A., JONES, B. D. & POHLENZ, J. (2002): Early epithelial invasion by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. *Vet. Pathol.* **39**: 712 – 720
- MICHIELS, T., WATTIAU, P., BRASSEUR, R., RUYSSCHAERT & J.-M., CORNELIS, G. (1990): Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect. Immun.* **58**: 2840 – 2849
- MILLER, W. L., PABBARAJU, K. & SANDERSON, K. E. (2000): Fragmentation of 23 S rRNA in strains of *Proteus* and *Providencia* results from intervening sequences in the *rrn* (rRNA) genes. *J. Bacteriol.* **182** (4): 1109 – 1117
- MIMS, C., PLAYFAIR, J., ROITT, I., WAKELIN, D. & WILLIAMS, R. (1998): Medical Microbiology; II. Edition; Mosby International Limited London-Philadelphia-St. Louis-Sydney-Tokyo
- MOBLEY, H. L., JARVIS, K. G., ELWOOD, J. P., WHITTLE, D. I., LOCKATELL, C. V., RUSSELL, R. G., JOHNSON, D. E., DONNENBERG, M. S. & WARREN, J. W. (1993): Isogenic P-fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol. Microbiol.* **10**: 143 - 155
- MONZON, M., GARCIA-ALVAREZ, F., LACLERIGA, A. & AMORENA, B. (2002): Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. *Acta Orthop. Scand.* **73**: 11 - 19
- MONZON, M., GARCIA-ALVAREZ, F., LACLERIGA, A., GRACIA, E., LEIVA, J., OTEIZA, C. & AMORENA, B. (2001): A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and study antibiotic treatment. *J. Orthop. Res.* **19**: 820 - 826
- MUKHOPADHYAY, S., AUDIA, J. P., ROY, R. N. & SCHELLHORN, H. E. (2000): Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol. Microbiol.* **37**: 371 - 381
- NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D. & EHRHARDT, W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255 – 262
- NEWTON, C. R. & GRAHAM, A. (1994): PCR; 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin
- NGUYEN, L. L., NELSON, C. L., SACCENTE, M., SMELTZER, M. S., WASSELL, D. L. & MC LAREN, S. G. (2002): Detecting bacterial colonization of implanted orthopaedic devices by ultrasonication. *Clin. Orthop.* **403**: 29 - 37
- NILSSON, C. L., COOPER, H. J., HAKANSSON, K., MARSHALL, A. G., OSTBERG, Y., LAVRINOVICHA, M. & BERGSTROM, S. (2002): Characterization of the P13 membrane protein of *Borrelia burgdorferi* by mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**: 295 – 309

- OCHMAN, H. & SELANDER, R. K. (1984): Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* **157**: 690 – 693
- OLSEN, A., JANSSON, A. & NORMARK, S. (1989): Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**: 652 - 655
- ORSKOV, F. (1978): Virulence faktors of the bacterial cell surface. *J. Infect. Dis.* **137**: 630 – 633
- OTTO, K. & SILHAVY, T. J. (2002): Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 2287 – 2292
- PABBARAJU, K. & SANDERSON, K. E. (2000): Sequence diversity of intervening sequences (IVSs) in the 23 S ribosomal RNA in *Salmonella* spp.. *Gene* **253**: 55 – 66
- PARK, S. R., MACKAY, W. G. & REID, D. C. (2001): *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res.* **35**: 1624 - 1626
- PARKER, C. T. & GUARD-PETTER, J. (2001): Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in chicks. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**: 287 – 291
- PARKHILL, J., DOUGAN, G., JAMES, K. D., THOMSON, N. R., PICKARD, D., WAIN, J., CHURCHER, C., MUNGALL, K. L., BENTLEY, S. D., HOLDEN, M. T., SEBAIHIA, M., BAKER, S., BASHAM, D., BROOKS, K., CHILLINGWORTH, T., CONNERTON, P., CRONIN, A., DAVIS, P., DAVIES, R. M., DOWD, L., WHITE, N., FARRAR, J., FELTWELL, T., HAMLIN, N., HAQUE, A., HIEN, T. T., HOLROYD, S., JAGELS, K., KROGH, A., LARSEN, T. S., LEATHER, S., MOULE, S., O'GAORA, P., PARRY, C., QUAIL, M., RUTHERFORD, K., SIMMONDS, M., SKELTON, J., STEVENS, K., WHITEHEAD, S. & BARRELL, B. G. (2001): Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**: 848 - 852
- PARKINNEN, J., HACKER, J. & KORHONEN, T. K. (1991): Enhancement of tissue plasminogen activator-catalysed plasminogen activation by *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal septicaemia and meningitis. *Thromb. Haemost.* **65**: 483 - 486
- PARR, L. W. (1938): Coliform intermediates in human feces. *J. Bacteriol.* **36**: 1 – 15
- PASTER, B. J., BOCHES, S. K., GALVIN, J. L., ERICSON, R. E., LAU, C. N., LEVANOS, V. A., SAHASRABUDHE, A. & DEWHIRST, F. E. (2001): Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**: 3770 - 3783.
- PEI, J. & GRISHIN, N. V. (2001): GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins* **42**: 210 - 216
- PRATT, L. A. & SILHAVY, T. J. (1995): Porin regulon of *Escherichia coli*. Aus: HOCH, J. A. & SILHAVY, T. J. (ed.): Two-component signal transduction; American Society for Microbiology Press Washington, D. C.: 105 - 127

- PRIGENT-COMBARET, C., BROMBACHER, E., VIDAL, O., AMBERT, A., LEJEUNE, P., LANDINI, P. & DOREL, C. (2001): Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol.* **183**: 7213 – 7223
- PRIGENT-COMBARET, C., VIDAL, O., DOREL, C. & LEJEUNE, P. (1999): Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5993 – 6002
- RABSCH, W., ANDREWS, H. L., KINGSLEY, R. A., PRAGER, R., TSCHÄPE, H., ADAMS, L. G. & BÄUMLER, A. J. (2002): *Salmonella enterica* serotype typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* **70**: 2249 – 2255
- RAMESH, N., JOSEPH, S. W., CARR, L. E., DOUGLASS, L. W. & WHEATON, F. W. (2002): Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poult. Sci.* **81**: 904 – 910
- REEVES, M. W., EVINS, G. M., HEIBA, A. A., PLIKAYTIS, B. D. & FARMER III, J. J. (1989): Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov.. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 313 - 320
- RICHTER, G. (1988): Stoffwechselphysiologie der Pflanzen; 5. Auflage; Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York
- ROBERTS, J. A., KAACK, M. B., BASKIN, G., MARKLUND, B. I. & NORMARK, S. (1997): Epitopes of the P-fimbrial adhesin of *E. coli* cause different urinary tract infections. *J. Urol.* **158**: 1610 - 1613
- RÖMLING, U. & ROHDE, M. (1999): Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level. *FEMS Microbiology Letters* **180**: 91 - 102
- RÖMLING, U. (2001): Genetic and phenotypic analysis of multicellular behaviour in *Salmonella* Typhimurium. *Methods Enzymol.* **336**: 48 – 59
- RÖMLING, U. (2002): Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* **153**: 205 - 212
- RÖMLING, U., BIAN, Z., HAMMAR, M., SIERRALTA, W. D. & NORMARK, S. (1998A): Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* **180**: 722 - 731
- RÖMLING, U., BOKRANZ, W., RABSCH, W., ZOGAJ, X., NIMTZ, M. & TSCHÄPE, H. (2003): Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 273 - 285
- RÖMLING, U., ROHDE, M., OLSEN, A., NORMARK, S. & REINKÖSTER, J. (2000): *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* **36**: 10 – 23



- RÖMLING, U., SIERRALTA, W. D., ERIKSON, K. & NORMARK, S. (1998B): Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* **28**: 249 - 264
- ROSAN, B. & LAMONT, R. J. (2000): Dental plaque formation. *Microbes Infect.* **2**: 1599 - 1607
- ROSS, P., WEINHOUSE, H., ALONI, Y., MICHAELI, D., WEINBERGER-OHANA, P., MAYER, R., BRAUN, S., DE VROOM, E., VAN DER MAREL, G. A., VAN BOOM, J. H. & BENZIMAN, M. (1987): Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279 - 281
- ROZALSKA, B., LJUNGH, A., PAZIAK-DOMANSKA, B. & RUDNICKA, W. (1996): Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on biomaterial-associated staphylococcal infection in mice. *Microbiol. Immunol.* **40**: 931 - 939
- SAKELLARIS, H., HANNINK, N. K., RAJAKUMAR, K., BULACH, D., HUNT, M., SASAKAWA, C. & ADLER, B. (2000): Curli loci of *Shigella* spp.. *Infect. Immun.* **68**: 3780 – 3783
- SCHLEGEL, H. G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie; 7. Auflage; Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York
- SCHNAITMAN, C. A. (1971): Solubilization of the cytoplasmatic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-10: *Bacteriology* **108**: 545 – 552
- SCHNAITMAN, C. A. (1981): Cell fractionation. Aus: GERHARDT, P., MURRAY, R. G. E., COSTILOW, R. N., NESTER, E. W., WOOD, W. A., KRIEG, N. R., BRIGGS PHILLIPS, G. ET AL.: Manual of Methods for General Bacteriology; American Society for Microbiology Press Washington, D. C.: 52 - 61
- SCHNEIDER, K. (1975): Reinigung und Charakterisierung der löslichen Hydrogenase von *Alcaligenes eutrophus*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Georg-August-Universität Göttingen
- SHIAU, A. L. & WU, C. L. (1998): The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol. Immunol.* **42**: 33 - 40
- SINGER, M. & BERG, P. (1992): Gene und Genome; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin
- SINGH, P. K., PARSEK, M. R., GREENBERG, E. P. & WELSH, M. J. (2002): A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**: 552 - 555
- SJÖBRING, U., POHL, G. & OLSEN, A. (1994): Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella* Enteritidis expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol. Microbiol.* **14**: 443 – 452

- SKERRA, A. (1994): Use of a tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**: 131 – 135
- SKURNIK, M. & TOIVANEN, P. (1991): Intervening sequences (IVSs) in the 23 S ribosomal RNA genes of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. The IVSs in *Y. enterocolitica* and *Salmonella* Typhimurium have a common origin. *Mol. Microbiol.* **5**: 585 - 593
- SOLANO C., GARCIA B., VALLE J., BERASAIN C., GHIGO J. M., GAMAZO C., LASA I. (2002): Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* **43**: 793 - 808
- STASKAWICZ, B., DAHLBECK, D., KEEN, N. & NAPOLI, C. (1987): Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* **169**: 5789 - 5794
- SUKUPOLVI, S., EDELSTEIN, A., RHEN, M., NORMARK, S. J. & PFEIFER, J. D. (1997A): Development of a murine model of chronic *Salmonella* infection. *Infect. Immun.* **65**: 838 – 842
- SUKUPOLVI, S., LORENZ, R. G., GORDON, J. I., BIAN, Z., PFEIFER, J. D., NORMARK, S. J. & RHEN, M. (1997B): Expression of thin aggregative fimbriae promotes interaction of *Salmonella* Typhimurium SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**: 5320 – 5325
- SÜBMUTH, R., EBERSPÄCHER, J., HAAG, R. & SPRINGER, W. (1987): Biochemisch-Mikrobiologisches Praktikum; Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York
- TAL, R., WONG, H. C., CALHOON, R., GELFAND, D., FEAR, A. L., VOLMAN, G., MAYER, R., ROSS, P., AMIKAM, D., WEINHOUSE, H., COHEN, A., SAPIR, S., OHANA, P. & BENZIMAN, M. (1998): Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: Genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**: 4416 - 4425
- THOMSEN, L. E., OLSEN, J. E., FOSTER, J. W. & INGMER, H. (2002): ClpP is involved in the stress response and degradation of misfolded proteins in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Microbiology* **148**: 2727 – 2733
- THORNS, C. J. (2000): Bacterial food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech.* **19**: 226 – 239
- TIMMIS K. N. (2002): *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* **4**: 779 - 781
- UPDEGRAFF, D. M. (1969): Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* **32**: 420-424
- UZZAU S., LEORI G. S., PETRUZZI V., WATSON P. R., SCHIANCHI G., BACCIU D., MAZZARELLO V., WALLIS T. S. & RUBINO S. (2001): *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. *Infect. Immun.* **69**: 3092 - 3099

- VAN DE BELT, H., NEUT, D., SCHENK, W., VAN HORN, J. R., VAN DER MEI, H. C. & BUSSCHER, H. J. (2001): Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop. Scand.* **72**: 557 - 571
- VAN DER VELDEN, A. W. M., BÄUMLER, A. J., TSOLIS, R. M. & HEFFRON, F. (1998): Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. *Infect. Immun.* **66** (9): 2803 – 2808
- VASUDEVAN, P., NAIR, M. K., ANNAMALAI, T. & VENKITANARAYANAN, K. S. (2003): Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* **92**: 179 - 185
- VOET, D. & VOET, J. G. (1994): Biochemie; VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim
- VOLKOW, P., TELLEZ, O., VAZQUEZ, C., AGUILAR, C., VALENCIA, M., BARRERA, L., ALFERIAN, A., ZINSER, J., SOBREVILLA, P., ACOSTA, A., TEXCOCANO, J., VILAR-COMPTE, D. & REYNOSO, E. (1997): A single, double lumen high-flow catheter for patients undergoing peripheral blood stem cell transplantation. Experience at the National Cancer Institute in Mexico. *Bone Marrow Transplant.* **20**: 779 - 783
- VON EIFF, C., PETERS, G. & HEILMANN, C. (2002): Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *Staphylococci*. *Lancet. Infect. Dis.* **2**: 677 - 685
- WALKER, K. A., ATKINS, C. L. & OSUNA, R. (1998): Functional determinants of the *Escherichia coli* *fis* promoter: Roles of –35, –10 and transcription initiation regions in the response to stringent control and growth phase-dependent regulation. *J. Bacteriol.* **181**: 1269 – 1280
- WALTHERS, D., TRAN, V. K. & KENNEY, L. J. (2003): Interdomain linkers of homologous response regulators determine their mechanism of action. *J. Bacteriol.* **185**: 317 - 324
- WATTANAKAROON, W. & STEWART, P. S. (2000): Electrical enhancement of *Streptococcus gordonii* biofilm killing by gentamicin. *Arch. Oral. Biol.* **45**: 167 - 671
- WILSON, M. (2001): Bacterial biofilms and human disease. *Sci. Prog.* **84**: 235 - 254
- WILSON, J. W., OTT, C. M., RAMAMURTHY, R., PORWOLLIK, S., MC CLELLAND, M., PIERSON, D. L. & NICKERSON, C. A. (2002): Low-shear modeled microgravity alters the *Salmonella enterica* serovar typhimurium stress response in an RpoS-independent manner. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5408 – 5416
- YOSHIDA, T., CAI, S. J. S. & INOUE, M. (2002A): Interaction of EnvZ, a sensory histidine kinase, with phosphorylated OmpR, the cognate response regulator. *Mol. Microbiol.* **46**: 1283 - 1294

- YOSHIDA, T., QIN, L. & INOUE, M. (2002B): Formation of the stoichiometric complex of EnvZ, a histidine kinase, with its response regulator, OmpR. *Mol. Microbiol.* **46**: 1273 - 1282
- ZOGAJ, X., BOKRANZ, W., NIMTZ, M. & RÖMLING, U. (2003): Cellulose and curli fimbriae producing Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **71**: 4151 - 4158
- ZOGAY, X. (1999): Genetische Analyse des multizellulären Morphotyps in *Salmonella* Typhimurium. Diplomarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- ZOGAY, X., NIMTZ, M., ROHDE, M., BOKRANZ, W. & RÖMLING, U. (2001): The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39**: 1452 – 1463

## VII. Anhang:

**VII.A:** Übersicht über alle *Salmonella*-Stämme bezogen vom Robert-Koch-Institut, Wernigerode: *S. Typhim.* v. C. = *S. Typhimurium* var. Copenhagen; Prototr. = Prototrophie; nd = nicht durchgeführt

Herkunft	Lysotyp	Serotyp	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	Prototr.
Erkrankung, Indien	E1a	<i>S. Typhi</i>	<b>00-02714</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Indien	E1a	<i>S. Typhi</i>	<b>00-00768</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	auxotroph
Dauerausscheider, Leipzig	E1b	<i>S. Typhi</i>	<b>00-01630</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	auxotroph
Dauerausscheider, Schwerin	F4	<i>S. Typhi</i>	<b>00-02798</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Tropenaufenthalt	D1	<i>S. Typhi</i>	<b>00-03434</b>	saw(g)-/saw(db)(+)	prototroph
Erkrankung, Türkei	28	<i>S. Typhi</i>	<b>00-03728</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	auxotroph
Erkrankung, Labor Köln	C4	<i>S. Typhi</i>	<b>00-08661</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	auxotroph
Erkrankung, Kalabrien	T	<i>S. Typhi</i>	<b>00-10392</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Indonesien	F2	<i>S. Typhi</i>	<b>01-00176</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	auxotroph
Ausscheider, Cottbus	E1b	<i>S. Typhi</i>	<b>01-00051</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Ägypten	G1	<i>S. Typhi</i>	<b>01-01506</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Bangladesch	ubI	<i>S. Typhi</i>	<b>01-02300</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Iran	A	<i>S. Typhi</i>	<b>01-04943</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	auxotroph
Erkrankung, Pakistan	ubII	<i>S. Typhi</i>	<b>01-05139</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	auxotroph
Erkrankung, Pakistan	E1a	<i>S. Typhi</i>	<b>01-05989</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Italien	A	<i>S. Typhi</i>	<b>01-06137</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	auxotroph
Erkrankung, Deutschland	ut/ViQ	<i>S. Typhi</i>	<b>01-07794</b>	saw(db)-/saw(db)(+)	auxotroph
Erkrankung, Türkei	D6	<i>S. Typhi</i>	<b>01-07795</b>	saw(g)-/saw(db)(+)	auxotroph
Erkrankung, Pakistan	E1a	<i>S. Typhi</i>	<b>01-07796</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	auxotroph
andere Tiere	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>00-03726</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	prototroph
andere Tiere	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>00-02998</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>00-02997</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>00-02984</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>00-02114</b>	saw(p)(+)/saw(bb)(+)	prototroph
Schwein	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>00-01048</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	prototroph
Mensch	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>99-07230</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	prototroph
Mensch	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>99-02397</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>98-05543</b>	saw(db)-/saw(db)(+)	prototroph
Mensch	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>98-04389</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	prototroph
Schwein	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>97-07869</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	prototroph
Mensch	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>97-01185</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	prototroph
Fleisch/Fleischprodukte	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>96-08742</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	prototroph
Schwein	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>96-03644</b>	saw(bb)-/saw(bb)(+)	prototroph
Schwein	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>96-02404</b>	saw(bb)(+)/saw(g)(+)	prototroph
Mensch	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>96-02240</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	prototroph
Mensch	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>96-01171</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>89-00655</b>	bas(wr)-/saw(g)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>86-00656</b>	saw(p)(+)/saw(bb)(+)	auxotroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>63-00657</b>	saw(g)(+)/saw(g)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>61-00658</b>	saw(bb)(+)/saw(g)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>90-00659</b>	saw(g)(+)/saw(g)(+)	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>96 CB</b>	saw(db)-/saw(db)-	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Choleraesuis</i>	<b>SL2824</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	nd
Laborstamm	unbek.	<i>S. Abortusovis</i>	<b>318</b>	saw(g)-/saw(g)(+)	auxotroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Pullorum</i>	<b>89-00301</b>	saw(db)(+)/saw(db)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>86-00271</b>	saw(db)(+)/saw(db)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>86-00300</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>89-00027</b>	saw(db)(+)/saw(g)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>74-00146</b>	saw(db)(+)/saw(g)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>89-00005</b>	saw(db)(+)/saw(g)(+)	nd

unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>63-00914</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>61-00188</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>62-01283</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>61-00013</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>60-00795</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>59-02634</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>64-00953</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>58-00031</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>57-00925</b>	saw(db)+/saw(db)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>64-00509</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>63-00647</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>57-00860</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>60-00778</b>	saw(rbb)(+)/saw(rbb)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>64-00370</b>	saw(rbb)(+)/saw(rbb)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>München</b>	saw(db)(+)/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>63-00766</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)(+)	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>90-00078</b>	saw(db)+/saw(rbb)+	nd
unbekannt	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>Hardt-PT1</b>	saw(rbb)+/saw(rbb)+	nd
unbek.; Braunschweig	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>00-07121</b>	saw(db)+/saw(rbb)+	nd
Landgeflügel; Assam, Indien	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>00-01030</b>	saw(rbb)(+)/saw(rbb)+	nd
Landgeflügel; Assam, Indien	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>00-01028</b>	saw(rbb)(+)/saw(rbb)+	nd
Landgeflügel; Assam, Indien	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>00-01026</b>	saw(rbb)(+)/saw(rbb)+	nd
Legehennen, Hühnerfarm; Prilep	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>01-12103</b>	saw(db)+/saw(db)+	nd
Hühner; Probitip, Mazedonien	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>01-05880</b>	rbdar+/rbdar+	nd
Hühner; Porodin, Mazedonien	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>01-05877</b>	saw(db)+/saw(db)+	nd
Hühner; Porodin, Mazedonien	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>01-05873</b>	saw(bb)(+)/saw(db)+	nd
Huhn, Organ; Heide- Legehennen Fintel	unbek.	<i>S. Gallinarum</i>	<b>01-03972</b>	saw(db)(+)/saw(db)(+)	nd
Taube, Dresden	DT2	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-08774</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Bad Langensalza	DT2	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-07478</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Frankfurt/Oder	DT2	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-07087</b>	saw(g)-/saw(g)-	prototroph
Taube, Kiel	DT2	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-06699</b>	saw(bb)-/saw(g)-	prototroph
Taube, Potsdam	DT2	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-06506</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Bad Langensalza	DT99	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-00672</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Potsdam	DT99	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-00951</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Bad Langensalza	DT99	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>00-06356</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Dubai (VAE)	DT99	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>99-08950</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Stendal	DT99	<i>S. Typhim. v. C.</i>	<b>99-01184</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Göttingen	21/1	<i>S. Enteritidis</i>	<b>00- 04026/62</b>	rdar+/pdar+	prototroph
Mensch, Göttingen	21/1	<i>S. Enteritidis</i>	<b>00- 04026/64</b>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Göttingen	4/6	<i>S. Enteritidis</i>	<b>00-</b>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph

			<b>04156/45</b>		
Mensch, Iserlohn	4/6	<i>S. Enteritidis</i>	<b>00-04560/46</b>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Enteritidis</i>	<b>97-00728/26</b>	rdar+/rdar+	auxotroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Enteritidis</i>	<b>97-00728/28</b>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Enteritidis</i>	<b>00059/6</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
unbekannt	unbek.	<i>S. Enteritidis</i>	<b>00060/7</b>	rdar+/rdar+	prototroph
Mensch, Schwedt	DT193	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-04037/65</b>	rbdar+/saw(bb)-	auxotroph
Mensch, Schwedt	DT193	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-04037/66</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Ente, Potsdam	DT104	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-04012/67</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube, Potsdam	DT104	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-04013/68</b>	rbdar(+)/saw(bb)-	prototroph
Taube, Potsdam	DT104	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-04020/69</b>	rbdar(+)/saw(bb)-	prototroph
Taube, Potsdam	DT104	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-04020/70</b>	saw(db)(+)/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Chemnitz	DT17	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-03876/71</b>	rbdar(+)/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Chemnitz	DT17	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-03876/72</b>	rpdar(+)/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Chemnitz	DT104	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-03874/73</b>	rbdar(+)/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Chemnitz	DT104	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-03874/74</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Chemnitz	DT120	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-03875/75</b>	rbdar(+)/saw(bb)-	auxotroph
Mensch, Chemnitz	DT120	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-03875/76</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch, Göttingen	DT104	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-03924/43</b>	rbdar(+)/saw(bb)-	auxotroph
Mensch, Chemnitz	DT204	<i>S. Typhimurium</i>	<b>00-07081/44</b>	rbdar(+)/saw(bb)-	prototroph

**VII.B:** LT-Sammlung (LILLENGEN 1948): Die Buchstaben hinter der LT-Nummer ergeben sich aus der Anzahl an Phänotypen pro Stamm.

Herkunft	Lysotyp (Stamm)	Serotyp	Phänotyp (28° C/37° C)	Prototrophie
Mensch	<b>LT 1</b>	<i>S. Typhimurium</i>	rdar+/pas(+)	prototroph
Mensch	<b>LT 2</b>	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar(+)/saw(bb)-	prototroph
Mensch	<b>LT 3</b>	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	<b>LT 4</b>	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Vieh	<b>LT 5</b>	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Taube	<b>LT 6</b>	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Schaf	<b>LT 7A</b>	<i>S. Typhimurium</i>	bas-/saw(bb)-	prototroph
Schaf	<b>LT 7B</b>	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
Mensch	<b>LT 8A</b>	<i>S. Typhimurium</i>	bas-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	<b>LT 8B</b>	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Truthahn	<b>LT 9A</b>	<i>S. Typhimurium</i>	bas-/saw(bb)-	prototroph
Truthahn	<b>LT 9B</b>	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
Truthahn	<b>LT 9C</b>	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar<->/saw(bb)-	prototroph
Mensch	<b>LT 10A</b>	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	<b>LT 10B</b>	<i>S. Typhimurium</i>	bas<(+)>/saw(bb)-	prototroph
Mensch	<b>LT 10C</b>	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar<(+)>/saw(bb)-	prototroph

Ratte	LT 11	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 12A	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar++/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 12B	<i>S. Typhimurium</i>	saw(db)<->/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 13A	<i>S. Typhimurium</i>	rdar++/saw(p)+	prototroph
Mensch	LT 13B	<i>S. Typhimurium</i>	rdar+/saw(g)-	prototroph
Mensch	LT 13C	<i>S. Typhimurium</i>	saw(db)(+)/saw(g)-	prototroph
Mensch	LT 13D	<i>S. Typhimurium</i>	saw(db)-/saw(g)-	prototroph
Mensch	LT 13E	<i>S. Typhimurium</i>	bas++/saw(g)-	prototroph
Mensch	LT 13F	<i>S. Typhimurium</i>	bas+/saw(g)-	prototroph
Mensch	LT 14A	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 14B	<i>S. Typhimurium</i>	rdar+/pas-	prototroph
Mensch	LT 14C	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar++/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 14D	<i>S. Typhimurium</i>	bas+/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 14E	<i>S. Typhimurium</i>	bas++/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 14F	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 15	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 16A	<i>S. Typhimurium</i>	bas<->/saw(g)-	prototroph
Mensch	LT 16B	<i>S. Typhimurium</i>	rdar<(+)>/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 16C	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar<(+)>/saw(g)-	prototroph
Mensch	LT 18A	<i>S. Typhimurium</i>	rdar++/pas+	prototroph
Mensch	LT 18B	<i>S. Typhimurium</i>	bas+/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 19A	<i>S. Typhimurium</i>	bas-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 19B	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Henne	LT 20A	<i>S. Typhimurium</i>	saw(g)-/saw(g)-	prototroph
Henne	LT 20B	<i>S. Typhimurium</i>	saw(g)-/saw(bb)-	prototroph
Henne	LT 20C	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(db)+	prototroph
Henne	LT 20D	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 21A	<i>S. Typhimurium</i>	rdar+/pas+	prototroph
Mensch	LT 21B	<i>S. Typhimurium</i>	rdar+/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 21C	<i>S. Typhimurium</i>	pdar++/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 21D	<i>S. Typhimurium</i>	saw(db)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 21E	<i>S. Typhimurium</i>	bas-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 21F	<i>S. Typhimurium</i>	bas<->/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 21G	<i>S. Typhimurium</i>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 22A	<i>S. Typhimurium</i>	rdar(+)/rdar(+)	prototroph
Mensch	LT 22B	<i>S. Typhimurium</i>	saw(db)-/saw(bb)-	prototroph
Mensch	LT 22C	<i>S. Typhimurium</i>	saw(db)-/saw(db)-	prototroph
Mensch	LT 22D	<i>S. Typhimurium</i>	saw(bb)-/saw(db)-	prototroph

**VII.C:** Fäkalisolate; *E. coli* und andere Spezies (frische Isolate): Prototr. = Prototrophie; m = männlich; w = weiblich; nd = nicht durchgeführt; nt = nicht typisierbar; rau = ohne Antigene

Person	Geschlecht	Alter	Spezies	Serotyp	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	Prototr.
P2	m	8,5 Mon.	<i>R. ornithinolytica</i>	nd	<b>Fec1</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	nd
			<i>Citrobacter spec.</i>	nd	<b>Fec2</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont :H10	<b>Fec3</b>	rdar+/rbdar+	nd
			<i>C. freundii</i>	nd	<b>Fec4</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont :Hrauh	<b>Fec5</b>	rdar+/pdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	O125:Hnt	<b>Fec6</b>	bdar(+)/saw(bb)-	prototroph
			<i>Citrobacter spec.</i>	nd	<b>Fec7</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>Citrobacter spec.</i>	nd	<b>Fec8</b>	bdar-/saw(g)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont :H10	<b>Fec9</b>	rdar+/rbdar+	nd
P3	w	36 Jahre	<i>E. coli</i>	O86:H27	<b>Fec10</b>	rdar+/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O86:H27	<b>Fec11</b>	rdar+/saw(bb)-	nd



			<i>E. coli</i>	Ont:H10	<b>Fec12</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	O86:H27	<b>Fec13</b>	rdar+/saw(bb)-	nd
			<i>E. coli</i>	O86:H27	<b>Fec14</b>	rdar+/saw(bb)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont :H10	<b>Fec15</b>	rdar+/rdar+	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H4	<b>Fec34</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O9:H4	<b>Fec35</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	nd
P1	m	45 Jahre	nd	nd	<b>Fec16</b>	saw(p)-/pas-	nd
			<i>E. coli</i>	O8:H-	<b>Fec17</b>	rdar+/pas(wr)+	nd
			<i>C. freundii</i>	nd	<b>Fec18</b>	bdar-/saw(g)-	prototroph
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec19</b>	saw(bb)-/saw(p)+	nd
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec20</b>	saw(bb)-/saw(p)+	nd
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec21</b>	saw(p)-/pas-	nd
			nd	nd	<b>Fec22</b>	saw(bb)-/saw(p)+	nd
			<i>E. coli</i>	O18:H-	<b>Fec23</b>	rdar+/pdar(wr)+	prototroph
			<i>Citrobacter spec.</i>	nd	<b>Fec24</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			nd	nd	<b>Fec25</b>	saw(p)-/pas-	nd
			<i>E. coli</i>	O8:H-	<b>Fec26</b>	rdar+/pas(wr)+	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec27</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec28</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec29</b>	saw(bb)-/saw(p)+	nd
			<i>Klyvera spec.</i>	nd	<b>Fec30</b>	saw(g)-/saw(bb)(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec31</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H44	<b>Fec32</b>	saw(g)-/saw(bb)(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec33</b>	bdar-/saw(g)-	nd
F1V	m	28 Jahre	<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec36</b>	saw(p)-/pas-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec37</b>	saw(p)-/pas-	nd
			<i>E. coli</i>	O99:H33	<b>Fec38</b>	bdar(+)/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. sakazakii</i>	nd	<b>Fec39</b>	pdar++/pdar++	prototroph
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec40</b>	saw(p)-/pas-	nd
			<i>E. coli</i>	O75:H-	<b>Fec41</b>	rdar<(+)>/bas(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O75:H-	<b>Fec42</b>	rdar<(+)>/bas(+)	nd
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec43</b>	saw(p)-/pas-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec44</b>	saw(p)-/pas-	nd
			<i>E. coli</i>	O75:H-	<b>Fec45</b>	rdar<(+)>/bas(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O75:H-	<b>Fec46</b>	rdar<(+)>/bas(+)	nd
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec47</b>	saw(p)-/pas-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec48</b>	saw(p)-/pas-	nd
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec49</b>	saw(p)-/pas-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec50</b>	saw(p)-/pas-	nd
F1M	w	27 Jahre	<i>E. coli</i>	O11:H-	<b>Fec51</b>	rdar(+)/rbdar(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O11:H-	<b>Fec52</b>	rdar(+)/rbdar(+)	nd
			<i>E. coli</i>	O16:H-	<b>Fec53</b>	saw(g)-/saw(g)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O16:H-	<b>Fec54</b>	saw(g)-/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H33	<b>Fec55</b>	bdar(+)/saw(db)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O99:H33	<b>Fec56</b>	bdar(+)/saw(db)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:Hrauh	<b>Fec57</b>	bdar(+)/saw(db)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O99:H33	<b>Fec58</b>	bdar(+)/saw(db)-	nd
F1K5	m	7 Jahre	<i>E. coli</i>	O74:H6	<b>Fec59</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H6	<b>Fec60</b>	rdar+/rdar+	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H10	<b>Fec61</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H10	<b>Fec62</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	nd
			<i>K. oxytoca</i>	nd	<b>Fec63</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec64</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec65</b>	bdar-/bdar(wr)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O99:H33	<b>Fec66</b>	bdar-/bdar(wr)-	nd
F1K1	w	4 Jahre	<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec67</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	O99:H1	<b>Fec68</b>	rdar+/rdar+	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec69</b>	bdar(+)/bas-	prototroph

			<i>E. coli</i>	O99:H33	<b>Fec70</b>	bdar(+)/bas-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H10	<b>Fec71</b>	saw(sw)/saw(sw)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H10	<b>Fec72</b>	saw(sw)/saw(sw)-	nd
			<i>K. pneumonia</i>	nd	<b>Fec73</b>	saw(sw)/saw(sw)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec74</b>	saw(sw)/saw(sw)-	nd
F2V	m	39 Jahre	<i>E. coli</i>	Ont:H-	<b>Fec75</b>	saw(g)/saw(g)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H-	<b>Fec76</b>	saw(g)/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H-	<b>Fec77</b>	saw(g)/saw(g)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec78</b>	saw(g)/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	nd	<b>Fec79</b>	saw(g)/saw(g)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec80</b>	saw(g)/saw(g)-	nd
F2M	w	33 Jahre	<i>E. coli</i>	O44:H18	<b>Fec81</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec82</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	nd
			<i>E. coli</i>	O44:H18	<b>Fec83</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O44:H18	<b>Fec84</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	nd
			<i>E. coli</i>	O44:H18	<b>Fec85</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec86</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	nd
			<i>E. coli</i>	nd	<b>Fec87</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec88</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	nd
F2K5	m	5 Jahre	<i>E. coli</i>	Ont:H27	<b>Fec89</b>	rdar<(+)>/pdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H27	<b>Fec90</b>	rdar<(+)>/rdar+	nd
			<i>E. coli</i>	O44:H18	<b>Fec91</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O44:H18	<b>Fec92</b>	rbdar(+)/bas(wr)-	nd
			<i>E. coli</i>	O128:H2	<b>Fec93</b>	bdar(+)/saw(g)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O128:H2	<b>Fec94</b>	bdar(+)/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	O128:H2	<b>Fec95</b>	rbdar+/saw(g)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O128(rel.):H2	<b>Fec96</b>	rbdar+/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	O63:H-	<b>Fec97</b>	rbdar+)/bdar(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O44:H18	<b>Fec98</b>	pdar+/saw(p)(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O44:H2	<b>Fec99</b>	rbdar+/saw(g)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O128:H2	<b>Fec100</b>	rbdar+/saw(g)-	nd
F2K2	w	21 Mon.	<i>E. coli</i>	Ont:H16	<b>Fec101</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	O174:H2	<b>Fec102</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H16	<b>Fec103</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>Citrobacter spec.</i>	nd	<b>Fec104</b>	bdar-/saw(g)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H16	<b>Fec105</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>C. freundii</i>	nd	<b>Fec106</b>	bdar-/saw(g)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec107</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H25	<b>Fec108</b>	rbdar+/bdar(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O9:H12	<b>Fec109</b>	rbdar+/bdar(+)	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H16	<b>Fec110</b>	bdar-/saw(g)-	prototroph
			<i>Citrobacter spec.</i>	nd	<b>Fec111</b>	bdar-/saw(g)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H16	<b>Fec112</b>	rdar+/rdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	O174:H16	<b>Fec113</b>	rdar+/rdar+	nd
UP1	unbekannt	erwachsen	<i>E. coli</i>	O6:H-	<b>Fec114</b>	bas-/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O6:Hnt	<b>Fec115</b>	bas-/saw(bb)-	nd
			<i>E. coli</i>	O6:Hnt	<b>Fec116</b>	bas-/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O6:H-	<b>Fec117</b>	bas-/saw(bb)-	nd
UP2	unbekannt	erwachsen	<i>E. coli</i>	O1:H7	<b>Fec118</b>	bas(+)/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O1:H7	<b>Fec119</b>	bas(+)/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O1:H6	<b>Fec120</b>	bas(+)/saw(bb)-	nd
			<i>E. coli</i>	O1:H7	<b>Fec121</b>	bas(+)/saw(bb)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec122</b>	bas(+)/saw(bb)-	nd
K2-(2)	m	24 Mon.	<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Fec123</b>	saw(g)/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Fec124</b>	saw(g)/saw(bb)-	nd
			<i>E. spec.</i>	nd	<b>Fec125</b>	pdar++/pas++	prototroph
			nd	nd	<b>Fec126</b>	pdar++/pas++	nd

			<i>E. coli</i>	O2:H6	<b>Fec127</b>	rbdar+/rbdar+	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H6	<b>Fec128</b>	rbdar+/rbdar+	nd
K2-(4)	w	30 Mon.	<i>E. coli</i>	O15:H33	<b>Fec129</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O15:H33	<b>Fec130</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	nd
K3-(5)	m	33 Mon.	<i>E. coli</i>	O1:H6	<b>Fec131</b>	bas(wr)-/saw(db)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O1:H6	<b>Fec132</b>	bas(wr)-/saw(db)-	nd
			<i>E. coli</i>	O1:H6	<b>Fec133</b>	bas(wr)-/saw(db)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O8:H-	<b>Fec134</b>	bas(wr)-/saw(db)-	nd
K1-(6)	m	14 Mon.	<i>E. aerogenes</i>	nd	<b>Fec135</b>	pdar+/pdar++	prototroph
			nd	nd	<b>Fec136</b>	pdar+/pdar++	nd
			<i>E. coli</i>	O39:H21	<b>Fec137</b>	rdar+/rbdar(wr)+	prototroph
			<i>Klyvera spec.</i>	nd	<b>Fec166</b>	saw(p)+/saw(p)(+)	prototroph
			nd	nd	<b>Fec138</b>	rdar+/rbdar(wr)+	nd
			<i>K. oxytoca</i>	nd	<b>Fec139</b>	saw(sw)-/saw(p)+	prototroph
			nd	nd	<b>Fec140</b>	saw(sw)-/saw(p)+	nd
			<i>K. pneumonia</i>	nd	<b>Fec141</b>	saw(p)+/saw(p)++	prototroph
			nd	nd	<b>Fec142</b>	saw(p)+/saw(p)++	nd
			<i>E. cloacae</i>	nd	<b>Fec143</b>	saw(bb)-/saw(p)+	prototroph
			nd	nd	<b>Fec144</b>	saw(bb)-/saw(p)+	nd
K3-(8)	m	33 Mon.	<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Fec145</b>	saw(g)-/saw(bb)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec146</b>	saw(g)-/saw(bb)-	nd
K2-(10)	w	26 Mon.	<i>E. coli</i>	O17:H18	<b>Fec147</b>	bdar(+)/saw(bb)(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O17:H18	<b>Fec148</b>	bdar(+)/saw(bb)(+)	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:H48	<b>Fec149</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H48	<b>Fec150</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	nd
K1-(11)	m	10 Mon.	<i>E. coli</i>	O2:H6	<b>Fec151</b>	bdar(+)/bas(wr)(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O2:Hnt	<b>Fec152</b>	bdar(+)/bas(wr)(+)	nd
			<i>R. ornithinolytica</i>	nd	<b>Fec153</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	Ont:H1	<b>Fec167</b>	bdar(+)/bas(wr)(+)	prototroph
			<i>Klebsiella spec.</i>	nd	<b>Fec154</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	nd
			<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec155</b>	rdar+/bas(wr)(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O130:H27	<b>Fec156</b>	rdar+/bas(wr)(+)	nd
			<i>C. kos./farmeri</i>	nd	<b>Fec157</b>	saw(db)+/saw(db)(+)	prototroph
K2-(9)	m	22 Mon.	<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Fec158</b>	rdar+/bas(+)	prototroph
			<i>E. coli</i>	O175:H16	<b>Fec159</b>	rdar+/bas(+)	nd
			<i>E. coli</i>	O1:H-	<b>Fec160</b>	saw(g)-/saw(bb)-	prototroph
			<i>E. coli</i>	O1:H-	<b>Fec161</b>	saw(g)-/saw(bb)-	nd
			<i>P. mirabilis</i>	nd	<b>Fec162</b>	saw(dg)(+)/saw(dg)(+)	prototroph
			nd	nd	<b>Fec163</b>	saw(dg)(+)/saw(dg)+	nd
			<i>Klebsiella spec.</i>	nd	<b>Fec164</b>	saw(rsw)-/saw(p)-	prototroph
			nd	nd	<b>Fec165</b>	saw(rsw)-/saw(p)-	nd

**VII.D:** Uropathogene *E. coli*-Stämme (frische Isolate) und andere Spezies: m = männlich; w = weiblich; nd = nicht durchgeführt; nt = nicht typisierbar; rauh = ohne Antigene

Patient	Geschlecht	Spezies	Serotyp	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	Prototrophie
7656	w	<i>E. coli</i>	O102:H6	<b>Urp1</b>	saw(g)-/saw(g)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp2</b>	saw(g)-/saw(g)<->	nd
		nd	nd	<b>Urp3</b>	saw(g)-/saw(g)<->	nd
		nd	nd	<b>Urp4</b>	saw(g)-/saw(g)<->	nd
7708	m	<i>E. coli</i>	O6:H6	<b>Urp5</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp6</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	nd

		<i>E. coli</i>	nd	<b>Urp7</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp8</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	nd
		<i>E. coli</i>	nd	<b>Urp9</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp10</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	nd
		<i>E. coli</i>	O6(rel.):Hnt	<b>Urp11</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp12</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	nd
7674	w	<i>E. coli</i>	O2:Hnt	<b>Urp13</b>	rdar(+)/bas(wr)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp14</b>	rdar(+)/bas(wr)(+)	nd
		<i>E. coli</i>	nd	<b>Urp15</b>	rdar(+)/bas(wr)(+)	prototroph
		<i>E. coli</i>	O2:Hnt	<b>Urp16</b>	rdar(+)/bas(wr)(+)	nd
		<i>E. coli</i>	nd	<b>Urp17</b>	rdar(+)/bas(wr)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp18</b>	rdar(+)/bas(wr)(+)	nd
7673	w	<i>E. coli</i>	Orauh:H-	<b>Urp19</b>	bdar(+)/saw(g)-	prototroph
		<i>E. coli</i>	Orauh:H30	<b>Urp20</b>	rdar+/saw(bb)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp21</b>	rdar+/saw(bb)-	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:H30	<b>Urp22</b>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp23</b>	rbdar+/saw(bb)-	nd
		nd	nd	<b>Urp24</b>	rbdar+/saw(bb)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp25</b>	rbdar+/saw(bb)-	nd
7617	w	<i>E. coli</i>	Orauh:H18	<b>Urp26</b>	pdar++/pas(wr)+	prototroph
		nd	nd	<b>Urp27</b>	pdar++/pas(wr)+	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:H18	<b>Urp28</b>	rdar+/pdar++	prototroph
		nd	nd	<b>Urp29</b>	rdar+/pdar++	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:H18	<b>Urp30</b>	pdar++/pas(wr)+	prototroph
		nd	nd	<b>Urp31</b>	pdar++/pas(wr)+	nd
		nd	nd	<b>Urp32</b>	pdar++/pas(wr)+	prototroph
		nd	nd	<b>Urp33</b>	pdar++/pas(wr)+	nd
		nd	nd	<b>Urp34</b>	pdar++/pas(wr)+	prototroph
		nd	nd	<b>Urp35</b>	pdar++/pas(wr)+	nd
		nd	nd	<b>Urp36</b>	rdar+/pdar++	prototroph
		nd	nd	<b>Urp37</b>	rdar+/pdar++	nd
		nd	nd	<b>Urp38</b>	rdar+/pdar++	prototroph
		nd	nd	<b>Urp39</b>	rdar+/pdar++	nd
7619	w	<i>E. coli</i>	Orauh:Hnt	<b>Urp40</b>	saw(bb)-/saw(db)-	prototroph
		<i>E. coli</i>	Orauh:H35	<b>Urp41</b>	saw(db)-/saw(g)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp42</b>	saw(db)-/saw(g)<->	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:Hnt	<b>Urp43</b>	saw(db)-/saw(g)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp44</b>	saw(db)-/saw(g)<->	nd
7696	w	<i>E. coli</i>	O3:H4	<b>Urp45</b>	bdar(+)/bdar(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp46</b>	bdar(+)/bdar(+)	nd
		<i>E. coli</i>	O3:H17	<b>Urp47</b>	bdar(+)/bdar(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp48</b>	bdar(+)/bdar(+)	nd
7693	w	<i>E. coli</i>	O6:Hnt	<b>Urp49</b>	rbdar+/saw(g)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp50</b>	rbdar+/saw(g)-	nd
		nd	nd	<b>Urp51</b>	rbdar+/saw(g)-	prototroph
		<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Urp52</b>	rbdar+/saw(g)-	nd
		nd	nd	<b>Urp53</b>	rbdar+/saw(g)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp54</b>	rbdar+/saw(g)-	nd
		<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Urp55</b>	rdar+/saw(bb)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp56</b>	rdar+/saw(bb)(+)	nd
		<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Urp57</b>	rdar+/saw(bb)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp58</b>	rdar+/saw(bb)(+)	nd
7655	m	<i>E. coli</i>	Ont:H-	<b>Urp59</b>	rbdar(wr)(+)/saw(bb)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp60</b>	rbdar(wr)(+)/saw(bb)<->	nd
		<i>E. coli</i>	O6:H-	<b>Urp61</b>	rbdar(wr)(+)/saw(bb)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp62</b>	rbdar(wr)(+)/saw(bb)<->	nd
		nicht bestimmbar	nd	<b>Urp63</b>	rbdar(wr)(+)/saw(bb)<->	prototroph
		nd	nd	<b>Urp64</b>	rbdar(wr)(+)/saw(bb)<->	nd
12097	m	<i>E. coli</i>	O2:H6	<b>Urp65</b>	rbdar+/pdar++	prototroph

		nd	nd	<b>Urp66</b>	rbdar+/pdar++	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:H6	<b>Urp67</b>	rdar+/pdar++	prototroph
		nd	nd	<b>Urp68</b>	rdar+/pdar++	nd
		<i>E. coli</i>	O2:H6	<b>Urp69</b>	rdar+/pdar++	prototroph
		nd	nd	<b>Urp70</b>	rdar+/pdar++	nd
12068	w	<i>E. coli</i>	Ont:H-	<b>Urp71</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp72</b>	saw(sw)-/saw(sw)-	nd
12093	w	<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Urp73</b>	saw(g)-/saw(bb)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp74</b>	saw(g)-/saw(bb)-	nd
		nd	nd	<b>Urp75</b>	saw(g)-/saw(bb)-	prototroph
		nd	nd	<b>Urp76</b>	saw(g)-/saw(bb)-	nd
		<i>E. coli</i>	O6:H1	<b>Urp77</b>	rbdar(+)/rbdar+	prototroph
		nd	nd	<b>Urp78</b>	rbdar(+)/rbdar+	nd
		nd	nd	<b>Urp79</b>	rbdar(+)/rbdar+	prototroph
		nd	nd	<b>Urp80</b>	rbdar(+)/rbdar+	nd
12070	w	<i>Enterococcus spec.</i>	nd	<b>Urp81</b>	saw(g)-/saw(g)-	auxotroph
		nd	nd	<b>Urp82</b>	saw(g)-/saw(g)-	nd
		<i>E. coli</i>	O22:H-	<b>Urp83</b>	saw(bb)-/bas(wr)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp84</b>	saw(bb)-/bas(wr)(+)	nd
12028	m	<i>E. coli</i>	Ont:Hnt	<b>Urp85</b>	saw(p)+/pas+	prototroph
		nd	nd	<b>Urp86</b>	saw(p)+/pas+	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:H6	<b>Urp87</b>	bas(wr)-/bas(wr)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp88</b>	bas(wr)-/bas(wr)(+)	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:H6	<b>Urp89</b>	bas(wr)-/bas(wr)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp90</b>	bas(wr)-/bas(wr)(+)	nd
		<i>E. coli</i>	Orauh:H6	<b>Urp91</b>	saw(bb)(+)/saw(db)+	prototroph
12054	w	<i>E. coli</i>	O25:Hnt	<b>Urp92</b>	pas(wr)+/saw(bb)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp93</b>	pas(wr)+/saw(bb)(+)	nd
		<i>Enterococcus spec.</i>	nd	<b>Urp94</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	auxotroph
		nd	nd	<b>Urp95</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	nd
		<i>Enterococcus spec.</i>	nd	<b>Urp96</b>	saw(db)(+)/pas+	auxotroph
		nd	nd	<b>Urp97</b>	pas(wr)+/saw(bb)(+)	prototroph
		nd	nd	<b>Urp98</b>	pas(wr)+/saw(bb)(+)	nd

**VII.E:** EcoR-Sammlung (*E. coli*): Die Buchstaben hinter der EcoR-Nummer ergeben sich aus der Anzahl an Phänotypen pro Stamm. In Einzelfällen bei gleichem Phänotyp innerhalb eines Stammes wurde auch die Prototrophie hierbei berücksichtigt. I. = Isolat; F = Fäkalisolat; U = uropathogener Stamm; Prototr. = Prototrophie; m = männlich; w = weiblich

Herkunft	I.	Nr.	Stamm	Phänotyp (28° C/37° C)	Serotyp	Prototr.
Mensch (w), Iowa	F	<b>1</b>	<b>RM74A</b>	saw(bb)-/saw(db)-	ON:HN	prototroph
Mensch (m), New York	F	<b>2</b>	<b>STM1</b>	saw(g)-/saw(bb)(+)	ON:H32	prototroph
Hund, Massachusetts	F	<b>3</b>	<b>WIR1(a)</b>	saw(bb)-/bas-	O1:NM	prototroph
Mensch (w), Iowa	F	<b>4</b>	<b>RM39A</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	ON:HN	prototroph
Mensch (w), Iowa	F	<b>5</b>	<b>RM60A</b>	saw(bb)-/saw(db)-	O79:NM	prototroph
Mensch (m), Iowa	F	<b>6</b>	<b>RM66C</b>	saw(bb)-/saw(g)-	ON:NM	prototroph
Orang Utan, Washington (Zoo)	F	<b>7</b>	<b>RM73C</b>	rdar+/saw(sw)-	O85:HN	prototroph
Mensch (w), Iowa	F	<b>8</b>	<b>RM77C(b)</b>	bas-/saw(g)-	O86:NM	prototroph
Mensch (w), Schweden	F	<b>9 A</b>	<b>FN98</b>	rbaw-/rbabr(+)	ON:HM	prototroph
	F	<b>9 B</b>	<b>FN98</b>	saw(g)-/saw(db)-		prototroph
Mensch (w), New York	F	<b>10</b>	<b>ANI</b>	bas(+)/saw(g)(+)	O6:H10	prototroph
Mensch (w), Schweden	U	<b>11</b>	<b>C97</b>	saw(bb)-/bas-	O6:H10	prototroph
Mensch (w), Schweden	F	<b>12 A</b>	<b>FN59</b>	saw(sw)-/saw(g)-	O7:H32	prototroph
	F	<b>12 B</b>	<b>FN59</b>	saw(g)-/saw(g)-		prototroph
Mensch (w), Schweden	F	<b>13 A</b>	<b>FN10</b>	saw(sw)-/saw(g)-	ON:HN	prototroph
	F	<b>13 B</b>	<b>FN10</b>	saw(g)-/saw(g)-		prototroph
Mensch (w), Schweden	U	<b>14 A</b>	<b>P62</b>	saw(db)-/saw(db)(+)	OM:HN	prototroph

	U	<b>14 B</b>	<b>P62</b>	bdar-/saw(db)(+)		prototroph
	U	<b>14 C</b>	<b>P62</b>	pas(wr)-/saw(db)(+)		prototroph
Mensch (w), Schweden	F	<b>15 A</b>	<b>FN3</b>	bdar-/saw(db)(+)	O25:NM	prototroph
	F	<b>15 B</b>	<b>FN3</b>	rbdar(+)/saw(bb)-		prototroph
	F	<b>15 C</b>	<b>FN3</b>	pas+/saw(bb)-		prototroph
	F	<b>15 D</b>	<b>FN3</b>	saw(db)-/saw(g)-		prototroph
Leopard, Washington (Zoo)	F	<b>16 A</b>	<b>RM191F</b>	pdar+/saw(g)<->	ON:H10	prototroph
	F	<b>16 B</b>	<b>RM191F</b>	saw(bb)-/saw(g)-		prototroph
Schwein, Indonesien	F	<b>17</b>	<b>RM200Q</b>	pas++/pas++	O106:NM	prototroph
Affe, Washington (Zoo)	F	<b>18</b>	<b>RM210F</b>	bdar(+)/saw(g)-	O5:NM	prototroph
Affe, Washington (Zoo)	F	<b>19</b>	<b>RM210J</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	O5:HN	prototroph
Ochse, Bali	F	<b>20</b>	<b>RM213I</b>	saw(db)-/pas++	O89:HN	prototroph
Ochse, Bali	F	<b>21 A</b>	<b>RM213K</b>	pas+/pas++	O121:HN	prototroph
	F	<b>21 B</b>	<b>RM213K</b>	saw(db)-/saw(db)+		prototroph
	F	<b>21 C</b>	<b>RM213K</b>	saw(bb)-/saw(db)(+)		prototroph
Ochse, Bali	F	<b>22 A</b>	<b>RM215C</b>	pdar+/pas++	ON:HN	prototroph
	F	<b>22 B</b>	<b>RM215C</b>	saw(db)+/saw(g)-		prototroph
Elefant, Washington (Zoo)	F	<b>23 A</b>	<b>RM183E</b>	bdar(wr)-/saw(g)-	O86:H43	prototroph
	F	<b>23 B</b>	<b>RM183E</b>	bdar(wr)-/saw(g)-		auxotroph
Mensch (w), Schweden	F	<b>24</b>	<b>FN33</b>	saw(g)-/saw(g)-	O15:NM	prototroph
Hund, New York	F	<b>25 A</b>	<b>MSI</b>	rbdar(+)/saw(g)-	ON:HN	prototroph
	F	<b>25 B</b>	<b>MSI</b>	bdar-/saw(g)-		prototroph
Kind, Massachusetts	F	<b>26 A</b>	<b>LL</b>	bdar-/saw(g)-	O104:H21	prototroph
	F	<b>26 B</b>	<b>LL</b>	saw(db)-/saw(g)(+)		prototroph
Giraffe, Washington (Zoo)	F	<b>27 A</b>	<b>RM24J</b>	rdar+/bdar(wr)+	O104:NM	prototroph
	F	<b>27 B</b>	<b>RM24J</b>	rdar+/saw(db)+		prototroph
Mensch (w), Iowa	F	<b>28 A</b>	<b>RM52B</b>	rdar+/saw(g)(+)	O104:NM	prototroph
	F	<b>28 B</b>	<b>RM52B</b>	saw(sw)-/saw(g)-		prototroph
	F	<b>28 C</b>	<b>RM52B</b>	bas-/saw(db)(+)		prototroph
	F	<b>28 D</b>	<b>RM52B</b>	rdar+/saw(g)(+)		prototroph
	F	<b>28 E</b>	<b>RM52B</b>	rdar+/saw(db)+		prototroph
Känguruhratte, Nevada	F	<b>29 A</b>	<b>RM3A</b>	bdar(+)/saw(db)(+)	O150:H21	prototroph
	F	<b>29 B</b>	<b>RM3A</b>	saw(db)-/saw(db)(+)		prototroph
	F	<b>29 C</b>	<b>RM3A</b>	rdar+/saw(g)-		auxotroph
Bison, Alberta	F	<b>30</b>	<b>RM10A</b>	bdar(wr)-/saw(g)-	O113:H21	prototroph
Leopard, Washington (Zoo)	F	<b>31 A</b>	<b>RM12(c)</b>	pas+/saw(g)(+)	O79:H43	prototroph
	F	<b>31 B</b>	<b>RM12(c)</b>	rdar+/rdar+		prototroph
Giraffe, Washington (Zoo)	F	<b>32</b>	<b>RM28(f)</b>	rdar+/saw(g)-	O7:H21	prototroph
Schaf, Kalifornien	F	<b>33 A</b>	<b>RM56C</b>	rdar+/bdar(wr)+	O7:H21	prototroph
	F	<b>33 B</b>	<b>RM56C</b>	saw(bb)-/saw(g)(+)		prototroph
	F	<b>33 C</b>	<b>RM56C</b>	saw(db)-/saw(db)(+)		prototroph
	F	<b>33 D</b>	<b>RM56C</b>	rdar+/bdar+		prototroph
Hund, Massachusetts	F	<b>34 A</b>	<b>WIR2(a)</b>	saw(p)+/saw(g)<->	O88:NM	prototroph
	F	<b>34 B</b>	<b>WIR2(a)</b>	pas+/saw(db)(+)		prototroph
	F	<b>34 C</b>	<b>WIR2(a)</b>	pas+/saw(bb)<->		prototroph
Mensch (m), Iowa	F	<b>35 A</b>	<b>RM42B</b>	saw(bb)-/saw(bb)-	O1:NM	prototroph
	F	<b>35 B</b>	<b>RM42B</b>	saw(sw)-/saw(g)-		prototroph
Mensch (w), Iowa	F	<b>36</b>	<b>RM77B(b)</b>	saw(sw)-/saw(g)-	O79:H25	prototroph
Murmeltier, Washington (Zoo)	F	<b>37</b>	<b>RM44B</b>	saw(g)-/saw(g)-	ON:HN	prototroph
Mensch (w), Iowa	F	<b>38 A</b>	<b>RM75A</b>	saw(vdb)-/saw(db)-	O7:NM	prototroph
	F	<b>38 B</b>	<b>RM75A</b>	saw(g)-/saw(g)-		prototroph
Mensch (w), Schweden	F	<b>39</b>	<b>FN104</b>	saw(sw)-/saw(g)-	O7:NM	prototroph
Mensch (w), Schweden	U	<b>40</b>	<b>P60</b>	saw(sw)-/saw(g)-	O7:NM	prototroph
Mensch (m), Tonga	F	<b>41</b>	<b>T44</b>	saw(sw)-/saw(g)-	O7:NM	prototroph
Mensch (m), Massachusetts	F	<b>42</b>	<b>DAR1</b>	bdar+/saw(db)(+)	ON:H26	prototroph
Mensch (w), Schweden	F	<b>43</b>	<b>FN36</b>	saw(bb)-/saw(g)<->	ON:HN	prototroph
Puma, Washington (Zoo)	F	<b>44 A</b>	<b>RM189I</b>	saw(db)+/saw(db)-	ON:HN	prototroph
	F	<b>44 B</b>	<b>RM189I</b>	rdar+/saw(db)(+)		prototroph
Schwein, Indonesien	F	<b>45 A</b>	<b>RM201C</b>	saw(db)(+)/saw(db)(+)	ON:HM	prototroph

	F	45 B	RM201C	bdar-/saw(g)-		prototroph
	F	45 C	RM201C	bdar(+)/saw(g)-		prototroph
Affe, Washington (Zoo)	F	46	RM202F	saw(bb)-/saw(rbb)(+)	O1:H6	prototroph
Schaf, Neuguinea	F	47	RM211C	rdar+/saw(db)(+)	OM:H18	prototroph
Mensch (w), Schweden	U	48 A	C90	saw(bb)-/saw(db)+	ON:HM	auxotroph
	U	48 B	C90	saw(bb)-/saw(db)+		prototroph
	U	48 C	C90	bdar(wr)(+)/saw(db)+		prototroph
Mensch (w), Schweden	F	49 A	FN90	saw(sw)-/saw(g)-	O2:NM	auxotroph
	F	49 B	FN90	saw(sw)-/rbdar+		auxotroph
Mensch (w), Schweden	U	50	P97	bdar(+)/saw(g)(+)	O2:HN	prototroph
Kind, Massachusetts	F	51	DD	saw(db)-/saw(db)-	O25:HN	prototroph
Orang Utan, Washington (Zoo)	F	52	RM73A	bdar(wr)-/saw(g)-	O25:H1	auxotroph
Mensch (w), Iowa	F	53	RM33B	rdar+/saw(g)+	O4:HN	prototroph
Mensch, Iowa	F	54	RM64A	rdar+/saw(db)(+)	O25:H1	prototroph
Mensch (w), Schweden	F	55 A	FN4	saw(sw)-/saw(g)(+)	O25:H1	prototroph
	F	55 B	FN4	saw(g)-/saw(g)(+)		prototroph
Mensch (w), Schweden	U	56 A	P106	saw(db)-/saw(db)-	O6:H1	prototroph
	U	56 B	P106	saw(g)-/saw(db)-		prototroph
Gorilla, Washington (Zoo)	F	57	RM71B	saw(db)(+)/saw(db)(+)	ON:NM	prototroph
Löwe, Washington (Zoo)	F	58 A	RM185S	bdar(+)/saw(db)-	O112:H8	prototroph
	F	58 B	RM185S	bdar(+)/saw(g)-		prototroph
	F	58 C	RM185S	rdar+/saw(g)-		prototroph
Mensch (m), Massachusetts	F	59	SIL8	rdar+/saw(db)-	O4:H40	auxotroph
Mensch (w), Schweden	U	60 A	C89	saw(g)-/saw(g)-	O4:HN	prototroph
	U	60 B	C89	saw(db)-/saw(db)(+)		prototroph
Mensch (w), Schweden	F	61	FN23	bdar-/saw(db)-	O2:NM	auxotroph
Mensch (w), Schweden	U	62 A	P69	saw(db)(+)/saw(g)-	O2:NM	auxotroph
	U	62 B	P69	rbdar(+)/saw(g)-		auxotroph
Mensch (w), Schweden	F	63	FN21	saw(db)-/saw(bb)-	ON:NM	auxotroph
Mensch (w), Schweden	U	64	C70	saw(bb)-/saw(g)-	O75:NM	prototroph
Affe, Washington (Zoo)	F	65	RM202I	saw(g)-/saw(g)-	ON:H10	prototroph
Affe, Washington (Zoo)	F	66	RM209I	rdar+/saw(db)(+)	O4:H40	prototroph
Ziege, Indonesien	F	67 A	RM217T	bdar(wr)(+)/saw(db)(+)	O4:H43	prototroph
	F	67 B	RM217T	rbdar(+)/saw(db)-		prototroph
Giraffe, Washington (Zoo)	F	68 A	RM224H	saw(db)+/saw(g)(+)	ON:NM	prototroph
	F	68 B	RM224H	rdar+/saw(g)(+)		prototroph
Affe, Washington (Zoo)	F	69 A	RM45EM	saw(db)-/saw(g)-	ON:NM	prototroph
	F	69 B	RM45EM	saw(bb)-/saw(g)-		prototroph
Gorilla, Washington (Zoo)	F	70 A	RM70B	saw(db)-/saw(bb)-	O78:NM	prototroph
	F	70 B	RM70B	bdar(+)/saw(g)+		prototroph
	F	70 C	RM70B	saw(bb)-/saw(g)-		prototroph
	F	70 D	RM70B	rdar+/rdar+		prototroph
	F	70 E	RM70B	saw(db)-/saw(g)-		prototroph
Mensch (w), Schweden	U	71	ABU84	saw(g)-/saw(g)-	O78:NM	auxotroph
Mensch (w), Schweden	U	72 A	P68	saw(g)-/saw(g)-	O144:H8	prototroph
	U	72 B	P68	saw(db)-/saw(db)-		prototroph
	U	72 C	P68	rdar(wr)(+)/saw(db)(+)		prototroph
	U	72 D	P68	rdar+/rdar+		prototroph

**VII.F:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Abstrichprobe bei den frischen *E. coli*-Fäkalisolaten: Als 100 % wurde die Gesamtheit aller gefundenen *E. coli*-Phänotypen je Probe angesehen. D. Anz. Ph. = durchschnittliche Anzahl an Phänotypen; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung

Person	d. Anz. Ph.	rel. Anteil d. Phänotypen (28° C/37° C)
F1V	2	3 % bdar(+)/saw(bb)-; 97 % rdar<(+)>/bas(+)
F1M	3	3 % rdar(+)/rbdar(+); 47 % saw(g)-/saw(g)-; 50 % bdar(+)/saw(db)-
F1K5	3	1 % rdar+/rdar+; 94 % saw(sw)-/saw(sw)-; 5 % bdar-/bdar(wr)-
F1K1	3	3 % rdar+/rdar+; 3 % bdar(+)/bas-; 94 % saw(sw)-/saw(sw)-

F2V	1	100 % saw(g)-/saw(g)-
F2M	1	100 % rbdar(+)/bas(wr)-
F2K5	6	3 % rdar<(+)>/pdar+; 14 % rbdar(+)/bas(wr)-; 79 % bdar(wr)(+)/saw(g)-; 2 % rbdar+/saw(g)-; 1 % rbdar(+)/bdar(+); 1 % pdar+/saw(p)(+)
F2K2	3	98 % rdar+/rdar+; 1 % rbdar+/bdar(+); 1 % bdar-/saw(g)-
P1	4	1 % rdar+/pdar(wr)+; 17 % rdar+/pas(wr)+; 2 % bdar-/saw(g)-; 80 % saw(g)-/saw(bb)(+)
P2	3	0,2 % bdar(+)/saw(bb)-; 0,4 % rdar+/pdar+; 99,4 % rdar+/rbdar+
P3	3	67 % rdar+/rdar+; 3 % rdar+/saw(bb)-; 30 % saw(sw)-/saw(sw)-
UP1	1	100 % bas-/saw(bb)-
UP2	1	100 % bas(+)/saw(bb)-
K2-(2)	2	5 % saw(g)-/saw(bb)-; 95 % rbdar+/rbdar+
K2-(4)	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
K3-(5)	1	100 % bas(wr)-/saw(db)-
K1-(6)	1	100 % rdar+/rbdar(wr)+
K3-(8)	1	100 % saw(g)-/saw(bb)-
K2-(10)	2	4 % bdar(+)/saw(bb)(+); 96 % saw(bb)-/saw(bb)-
K1-(11)	2	40 % bdar(+)/bas(wr)(+); 60 % rdar+/bas(wr)(+)
K2-(9)	2	25 % rdar+/bas(+); 75 % saw(g)-/saw(bb)-
MW=	2,19	
STABW=	1,26	

**VII.G:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Urinprobe bei den frischen uropathogenen *E. coli*-Isolaten: Als 100 % wurde die Gesamtheit aller gefundenen *E. coli*-Phänotypen je Probe angesehen. D. Anz. Ph. = durchschnittliche Anzahl an Phänotypen; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung

Patient	d. Anz. Ph.	rel. Anteil d. Phänotypen (28° C/37° C)
7656	1	100 % saw(g)-/saw(g)<->
7708	1	100 % saw(bb)-/saw(g)<->
7674	1	100 % rdar(+)/bas(wr)(+)
7673	3	0,4 % bdar(+)/saw(g)-; 15 % rdar+/saw(bb)-; 84,6 % rbdar+/saw(bb)-
7617	2	41 % pdar++/pas(wr)+; 59 % rdar+/pdar++
7619	2	1 % saw(bb)-/saw(db)-; 99 % saw(db)-/saw(g)<->
7696	1	100 % bdar(+)/bdar(+)
7693	2	12 % rbdar+/saw(g)-; 88 % rdar+/saw(bb)(+)
7655	1	100 % rbdar(wr)(+)/saw(bb)<->
12097	2	3 % rbdar+/pdar++; 97 % rdar+/pdar++
12068	1	100 % saw(sw)-/saw(sw)-
12093	2	5 % saw(g)-/saw(bb)-; 95 % rbdar(+)/rbdar+
12070	1	100 % saw(bb)-/bas(wr)(+)
12028	3	98 % bas(wr)-/bas(wr)(+); 1 % saw(bb)(+)/saw(db)+; 1 % saw(p)+/pas+
12054	1	100 % pas(wr)+/saw(bb)(+)
MW=	1,6	
STABW=	0,71	

**VII.H:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Fäkal- bzw. Urinprobe bei anderen Spezies als *E. coli*: Als 100 % wurde die Gesamtheit der gefundenen Phänotypen aller Bakterienspezies je Probe angesehen. Im Falle einer Übereinstimmung des Phänotyps mit dem einer anderen Spezies derselben Probe ist der Anteil entweder eingeklammert oder aber mit einem Fragezeichen angegeben.

Spezies	Relativer Anteil der Phänotypen (28° C/37° C)	Person
<i>Citrobacter spec.</i>	1 % bdar-/saw(g)-	F2K2
	1,2 % bdar-/saw(g)-	P2
<i>Citrobacter freundii</i>	2 % bdar-/saw(g)-	F2K2
	6 % bdar-/saw(g)-	P1
<i>Citrobacter kos./farmeri</i>	0,2 % saw(db)+/saw(db)(+)	K1-(11)
<i>Enterobacter spec.</i>	2 % pdar++/pas++	K2-(2)



<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 % pdar+/pdar++	K1-(6)
<i>Enterobacter cloacae</i>	52 % saw(p)-/pas-	F1V
	60 % saw(bb)-/saw(p)+; 4 % saw(p)-/pas-	P1
	53 % saw(bb)-/saw(p)+	K1-(6)
<i>Enterobacter sakazakii</i>	13 % pdar++/pdar++	F1V
<i>Klebsiella spec.</i>	(6 %) saw(sw)-/saw(sw)-	K1-(11)
	48 % saw(rsw)-/saw(p)-	K2-(9)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	62 % saw(sw)-/saw(sw)-	F1K5
	20 % saw(sw)-/saw(p)+	K1-(6)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	66 % saw(sw)-/saw(sw)-	F1K1
	25 % saw(p)+/saw(p)++	K1-(6)
<i>Klyvera spec.</i>	? % saw(g)-/saw(bb)(+)	P1
	1 % saw(p)+/saw(p)(+)	K1-(6)
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2 % saw(sw)-/saw(sw)-	P2
	(6 %) saw(sw)-/saw(sw)-	K1-(11)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 % saw(dg)(+)/saw(dg)(+)	K2-(9)
<i>Enterococcus spec.</i>	45 % saw(g)-/saw(bb)-	12070
	4 % saw(bb)-/saw(bb)-; 1 % saw(db)(+)/pas+	12054

**VII.I:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm der EcoR-Fäkalisolate:  
D. Anz. Ph. = durchschnittliche Anzahl an Phänotypen; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung

Nr.	Stamm	d. Anz. Ph.	Relativer Anteil der Phänotypen (28° C/37° C)
1	RM74A	1	100 % saw(bb)-/saw(db)-
2	STM1	1	100 % saw(g)-/saw(db)(+)
3	WIR1(a)	1	100 % saw(bb)-/bas-
4	RM39A	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
5	RM60A	1	100 % saw(bb)-/saw(db)-
6	RM66C	1	100 % saw(bb)-/saw(g)-
7	RM73C	1	100 % rdar+/saw(sw)-
8	RM77C	1	100 % bas-/saw(g)-
9	FN98	2	3 % rbaw-/rbabr(+); 97 % saw(g)-/saw(db)-
10	ANI	1	100 % bas(+)/saw(g)(+)
12	FN59	2	99 % rdar+/saw(g)-; 1 % saw(db)-/saw(db)(+)
13	FN10	2	97 % saw(sw)-/saw(g)-; 3 % saw(g)-/saw(g)-
15	FN3	4	2 % bdar-/saw(db)(+); 7 % rbdar(+)/saw(bb)-; 4 % pas+/saw(bb)-; 87 % saw(db)-/saw(g)-
16	RM191F	2	4 % pdar+/saw(g)<->; 96 % saw(bb)-/saw(g)-
17	RM200Q	1	100 % pas++/pas++
18	RM210F	1	100 % bdar(+)/saw(g)-
19	RM210J	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
20	RM213I	1	100 % saw(db)-/pas++
21	RM213K	3	16 % pas+/pas++; 4 % saw(db)-/saw(db)+; 80 % saw(bb)-/saw(db)(+)
22	RM215C	2	4 % pdar+/pas++; 96 % saw(db)+/saw(g)-
23	RM183E	1	100 % bdar(wr)-/saw(g)-
24	FN33	1	100 % saw(g)-/saw(g)-
25	MSI	2	98 % rbdar(+)/saw(g)-; 2 % bdar-/saw(g)-
26	LL	2	49 % bdar-/saw(g)-; 51 % saw(db)-/saw(g)(+)
27	RM24J	2	5 % rdar+/bdar(wr)+; 95 % rdar+/saw(db)+
28	RM52B	5	36 % rdar+/saw(g)(+); 11 % saw(sw)-/saw(g)-; 1 % bas-/saw(db)(+); 1 % rdar+/saw(g)(+); 51 % rdar+/saw(db)+
29	RM3A	3	4 % bdar(+)/saw(db)(+); 6 % saw(bb)-/saw(db)(+); 90 % rdar+/saw(g)-
30	RM10A	1	100 % bdar(wr)-/saw(g)-
31	RM12(c)	2	1 % pas+/saw(g)(+); 99 % rdar+/rdar+
32	RM28(f)	1	100 % rdar+/saw(g)-
33	RM56C	4	9 % rdar+/rbdar(wr)+; 7 % saw(bb)-/saw(g)(+); 1 % saw(db)-/saw(db)(+); 83 % rdar+/bdar+
34	WIR2	3	3 % saw(p)+/saw(g)<->; 9 % pas+/saw(db)(+); 88 % pas+/saw(bb)<->

35	RM42B	2	1 % saw(bb)-/saw(bb)-; 99 % saw(sw)-/saw(g)-
36	RM77B(b)	1	100 % saw(sw)-/saw(g)-
37	RM44B	1	100 % saw(g)-/saw(g)-
38	RM75A	2	2 % saw(vdb)-/saw(db)-; 98 % saw(g)-/saw(g)-
39	FN104	1	100 % saw(sw)-/saw(g)-
41	T44	1	100 % saw(sw)-/saw(g)-
42	DAR1	1	100 % bdar+/saw(db)(+)
43	FN36	1	100 % saw(bb)-/saw(g)<->
44	RM189I	2	42 % saw(db)+/saw(db)-; 58 % rdar+/saw(db)(+)
45	RM201C	3	1 % saw(db)(+)/saw(db)(+); 1 % bdar-/saw(g)-; 98 % bdar(+)/saw(g)-
46	RM202F	1	100 % saw(bb)-/saw(rbb)(+)
47	RM211C	1	100 % rdar+/saw(db)(+)
49	FN90	2	1 % saw(sw)-/saw(g)-; 99 % saw(sw)-/bdar+
51	DD	1	100 % saw(bb)-/saw(g)-
52	RM73A	1	100 % bdar(wr)-/saw(g)-
53	RM33B	1	100 % rdar+/saw(g)+
54	RM64A	1	100 % rdar+/saw(db)(+)
55	FN4	2	99 % saw(sw)-/saw(g)(+); 1 % saw(g)-/saw(g)(+)
57	RM71B	1	100 % saw(bb)(+)/saw(g)(+)
58	RM185S	3	5 % bdar(+)/saw(db)-; 5 % bdar(+)/saw(g)-; 90 % rdar+/saw(g)-
59	SIL8	1	100 % rdar+/saw(db)-
61	FN23	1	100 % bdar-/saw(db)-
63	FN21	1	100 % saw(db)-/saw(bb)-
65	RM2021	1	100 % saw(g)-/saw(g)-
66	RM2091	1	100 % rdar+/saw(db)(+)
67	RM217T	2	1 % bdar(wr)(+)/saw(db)(+); 99 % rbdar(+)/saw(db)-
68	RM224H	2	1 % saw(db)+/saw(g)(+); 99 % rdar+/saw(g)(+)
69	RM45EM	2	2 % saw(db)-/saw(g)-; 98 % saw(bb)-/saw(g)-
70	RM70B	5	10 % saw(db)-/saw(bb)-; 1 % bdar(+)/saw(g)+; 1 % rdar+/rdar+; 1 % saw(db)-/saw(g)-; 87 % saw(bb)-/saw(g)-
	<b>MW=</b>	1,67	
	<b>STABW=</b>	1,00	

**VII.J:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm der EcoR-UPEC-Stämme:  
D. Anz. Ph. = durchschnittliche Anzahl an Phänotypen; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung

Nr.	Stamm	d. Anz. Ph.	Relativer Anteil der Phänotypen (28° C/37° C)
11	C97	1	100 % saw(bb)-/bas-
14	P62	3	3 % saw(db)-/saw(db)(+); 86 % bdar-/saw(db)(+); 11 % pas(wr)-/saw(db)(+)
40	P60	1	100 % saw(sw)-/saw(g)-
48	C90	2	18 % saw(bb)-/saw(db)+; 82 % bdar(wr)(+)/saw(db)+
50	P97	1	100 % bdar(+)/saw(g)(+)
56	P106	2	1 % saw(db)-/saw(db)-; 99 % saw(g)-/saw(db)-
60	C89	2	99 % saw(g)-/saw(g)-; 1 % saw(db)-/saw(db)(+)
62	P69	2	21 % saw(db)(+)/saw(g)(+); 79 % rbdar(+)/saw(g)(+)
64	C70	1	100 % saw(bb)-/saw(g)-
71	ABU84	1	100 % saw(g)-/saw(g)-
72	P68	4	2 % saw(g)-/saw(g)-; 1 % saw(db)-/saw(db)-; 2 % rbdar(wr)(+)/saw(db)(+); 95 % rdar+/rdar+
	<b>MW=</b>	1,90	
	<b>STABW=</b>	0,98	

**VII.K:** Häufigkeitsverteilung der Gesamt-Phänotypen (28° C/37° C) pro Stamm der LT-Stämme: D. Anz. Ph. = durchschnittliche Anzahl an Phänotypen; MW = Mittelwert; STABW = Standardabweichung

Stamm	d. Anz. Ph.	Relativer Anteil der Phänotypen (28° C/37° C)
LT 1	1	100 % rdar+/pas(+)
LT 2	1	100 % rbdar(+)/saw(bb)-
LT 3	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 4	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 5	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 6	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 7	2	23 % bas-/saw(bb)-; 77 % rbdar+/saw(bb)-
LT 8	2	2 % bas-/saw(bb)-; 98 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 9	3	5 % pas+/saw(bb)-; 28 % rbdar+/saw(bb)-; 67 % rbdar<->/saw(bb)-
LT 10	3	1 % saw(bb)-/saw(bb)-; 3 % bas<(+)>/saw(bb)-; 96 % rbdar<(+)>/saw(bb)-
LT 11	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 12	2	15 % rbdar++/saw(bb)-; 85 % saw(db)<->/saw(bb)-
LT 14	6	2 % saw(bb)-/saw(bb)-; 1 % rdar+/pas-; 25 % rbdar++/saw(bb)-; 5 % bas+/saw(bb)-; 5 % bas++/saw(bb)-; 62 % rbdar+/saw(bb)-
LT 15	1	100 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 16	3	5 % bas<->/saw(g)-; 7 % rdar<(+)>/saw(bb)-; 88 % rbdar<(+)>/saw(g)-
LT 13	6	1 % rdar++/saw(p)+; 2 % rdar+/saw(g)-; 29 % saw(db)(+)/saw(g)-; 9 % saw(db)-/saw(g)-; 4 % bas++/saw(g)-; 55 % bas+/saw(g)-
LT 18	2	17 % rdar++/pas+; 83 % bas+/saw(bb)-
LT 19	2	4 % bas-/saw(bb)-; 96 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 20	4	2 % saw(g)-/saw(g)-; 1 % saw(g)-/saw(bb)-; 8 % saw(bb)-/saw(db)+; 89 % saw(bb)-/saw(bb)-
LT 21	7	2 % rdar+/pas+; 18 % rdar+/saw(bb)-; 3 % rbdar++/saw(bb)-; 2 % saw(db)-/saw(bb)-; 27 % bas-/saw(bb)-; 1 % bas<->/saw(bb)-; 48 % rbdar+/saw(bb)-
LT 22	4	1 % rdar(+)/rdar(+); 4 % saw(db)-/saw(bb)-; 1 % saw(db)-/saw(db)-; 94 % saw(bb)-/ saw(db)-
MW=	2,57	
STABW=	1,81	



## VIII. Danksagungen:

Diese Arbeit wurde in der dem Fachbereich „Zell- und Immunbiologie“ angeschlossenen Nachwuchsforschergruppe „Klonale Variabilität“ unter der Leitung von Frau Priv. Doz. Dr. Ute Römling an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung m.b.H. in Braunschweig erstellt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

- der Leiterin unserer Arbeitsgruppe Priv. Doz. Dr. Ute Römling für die intensive Betreuung und Korrektur der Arbeit.
- dem Fachbereichsleiter Prof. Dr. Jürgen Wehland für die Übernahme des ersten Referates und die Geduld, die er mir gegenüber gezeigt hat.
- Prof. Dr. Helmut Tschäpe vom Robert-Koch-Institut, Wernigerode, für die Serotypisierung der *E. coli*-Stämme und die spontane Übernahme des zweiten Referates.
- Dr. Wolfgang Rabsch und seinen Mitarbeitern vom Robert-Koch-Institut, Wernigerode, für ihren Einsatz beim Screenen von *Salmonella*-Wildtypstämmen und dafür, dass sie mir einige von diesen zur Verfügung gestellt haben.
- Prof. Dr. Wilfried Bautsch vom Bereich Mikrobiologie des Städtischen Klinikums dafür, dass er mir für diese Arbeit zahlreiche uropathogene *E. coli*-Stämme zur Verfügung gestellt hat.
- Dr. Manfred Nimtz, Sabrina Herrmann und Jaqueline Majewsky für die Durchführung des AgfA-Nachweises am MALDI/TOF-MS und die Zellulosebestimmung.
- Priv. Doz. Dr. Dirk Heinz und Viola Beyer für die molekularbiologische Überprüfung des GGDEF-GST-Fusionsproteins.
- Dr. Manfred Rohde und Elruth Müller für den Versuch der AdrA-Lokalisation via EM-Studien.
- Petra Hagendorff für die Sequenzierungen zu Beginn der Arbeit.
- den Mitarbeitern der „Klonalen Variabilität“, Dr. Andreas Kresse, Ulrich Gerstel, Xhavit Zogay, Sriramulu D. Dinesh und Anja Arms sowie Marlies Konradt, meiner Arbeitsplatznachbarin, für die gute Zusammenarbeit und die gute Stimmung im Labor.
- allen übrigen Mitarbeitern der „Zell- und Immunbiologie“, insbesondere Dirk Wehmhöner, Sascha Pust, Michael Templin, Jessica Schaumburg, Maja Baumgärtner, Matthias Machner, Melanie Barzik und Tobias Sperka für das gute Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.